

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97191624.1

[51] Int. Cl.

C07C 67/00 (2006.01)
C07C 253/00 (2006.01)
C07C 69/76 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 15/00 (2006.01)
C07F 9/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1252029C

[51] Int. Cl. (续)

C07F 9/02 (2006.01)

C07D 305/14 (2006.01)

[22] 申请日 1997.11.7 [21] 申请号 97191624.1

[30] 优先权

[32] 1996.11.8 [33] US [31] 08/748,107

[86] 国际申请 PCT/US1997/019618 1997.11.7

[87] 国际公布 WO1998/019989 英 1998.5.14

[85] 进入国家阶段日期 1998.7.8

[71] 专利权人 鲁米根公司

地址 美国密歇根州

[72] 发明人 哈希姆·阿克海瓦-塔费蒂

扎拉·阿格哈瓦尼

雷努卡·德席尔瓦 库马·撒库尔

审查员 李亚林

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 8 页 说明书 36 页 附图 5 页

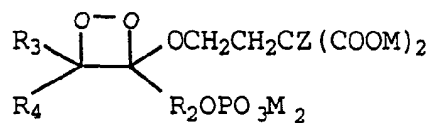
[54] 发明名称

具有增强贮存稳定性的水溶性的三取代 1,2 -
二噁丁环,合成方法以及中间产品

[57] 摘要

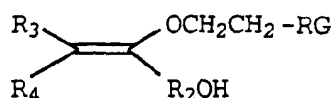
本发明提供了稳定的酶催触发化学发光的 1, 2 - 二噁丁环, 其具有改进的水溶性和贮存稳定性, 本发明还提供了其合成方法和制备中所用的中间体。该二噁丁环进一步用两个或多个排列于该二噁丁环结构上的水溶性基团和另外的氟原子或低级烷基取代, 其在用于在胶囊化学分析系统上使用的测试法中时, 通过消除试剂携带问题而提供了优越的性能。这些二噁丁环表现出基本改进的贮存稳定性。本发明还提供了包含这些二噁丁环, 一种非聚合阳离子表面活性增强剂和一种任选的荧光增白剂的组合物, 用以提供强化学发光。

1. 一种制备具有下式的二噁丁环盐化合物的方法，

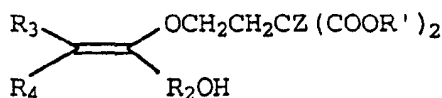


5 其具有高贮存稳定性，其中 R_3 和 R_4 均可选自非环、单环、多环有机基团，这些有机基团能任选被杂原子取代，并且 R_3 和 R_4 可任选连接在一起形成螺合到二噁丁环的环上的单环或多环基团；其中 R_2 是选自苯基和萘基的芳环基，其可以包含附加的取代基，其中 Z 选自卤素原子和含有 1-4 个碳原子的烷基， M 选自氢，碱金属离子或季铵或季磷离子，该方法包括以下步骤：

10 a) 将具有下式的第一烯烃化合物与一种 Z -取代的丙二酸酯和一种碱反应，



其中 RG 是一个可除去基团，生成具有下式的丙二酸酯取代的烯烃化合物：

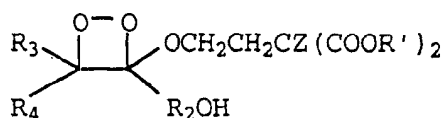


15

其中 R' 是一个具有 1-4 个碳的烷基；

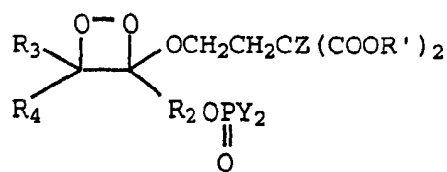
b) 在氧和丙二酸酯取代的烯烃化合物的存在下，通过照射敏化剂来光氧化丙二酸酯取代的烯烃化合物，形成具有下式的丙二酸酯取代的二噁丁

20 环：



；

c) 将丙二酸酯取代的二噁丁环与式为 $\text{WP}(\text{O})\text{Y}_2$ 的磷酸化试剂反应，其中， W 和 Y 均是从卤素原子，取代或非取代烷氧基，芳氧基，芳烷氧基和
25 三烷基甲硅烷基氧基中选出，生成具有下式的磷酸化的二噁丁环化合物；

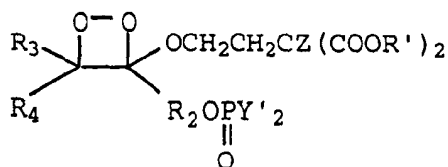


和

d)在水性溶剂中用式为 M-Q 的碱水解磷酸化的二噁丁环，其中 Q 是碱性阴离子，形成二噁丁环盐化合物。

- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中丙二酸酯取代的二噁丁环化合物与磷酸化试剂反应的步骤包含下面几个步骤：

a)将丙二酸酯取代的二噁丁环化合物与具有式 $\text{WP}(\text{O})\text{Y}'_2$ 的磷酸化试剂反应，其中 Y' 是卤素原子，生成具有下式的二噁丁环磷酰基卤化物：

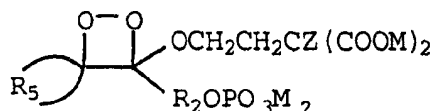


和

- 10 b)将二噁丁环磷酰基卤化物与具有式 $\text{Y}-\text{OH}$ 的羟基化合物反应，其中 Y 是从取代或者未取代的烷基中选出的，生成磷酸化的二噁丁环化合物，其中 $\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, \text{R}'$ 和 Z 的定义如权利要求 1 所述。

3. 权利要求 1 的方法，其中试剂 $\text{WP}(\text{O})\text{Y}_2$ 为 POCl_3 。

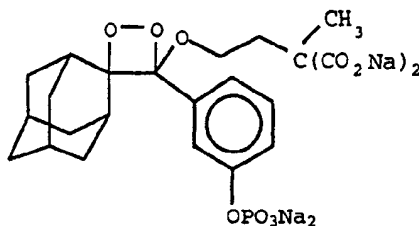
4. 权利要求 1 的方法，其中 R_3 和 R_4 结合在一起形成单环或多环并螺
15 合到二噁丁环环上的 R_5 基团，并且该二噁丁环盐化合物具有如下结构：



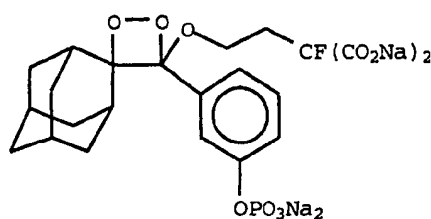
其中 R_2, M 和 Z 的定义如权利要求 1 所述。

5. 权利要求 4 的方法，其中 R_5 是一个取代或者未取代的金刚烷基。
6. 权利要求 1 的方法，其中 R_2 是一个取代或未取代的间苯基。
20 7. 权利要求 1 的方法，其中 Z 是从 F 和 CH_3 中选出的，而 M 是 Na。
8. 权利要求 5 的方法，其中 Z 是从 CH_3 和 F 中选出的，M 是 Na， R_2 是一个取代或未取代的间苯基。

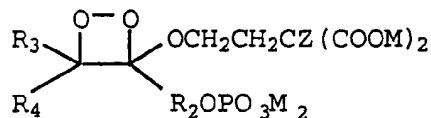
9. 权利要求 5 的方法，其中 Z 是 CH_3 ，M 是 Na， R_2 是一个未取代的间苯基， R_5 是一个未取代的金刚烷基，并且该二噁丁环盐化合物具有如下结
25 构式：



10. 权利要求 5 的方法，其中 Z 是 F，M 是 Na，R₂ 是一个未取代的间苯基，R₅ 是一个未取代的金刚烷基，并且该二噁丁环盐化合物具有如下结构：



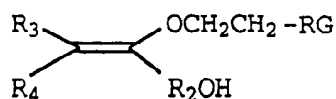
11. 一种制备具有下式的二噁丁环盐化合物的方法，



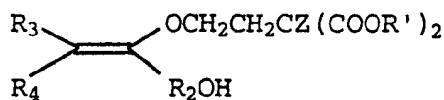
10

- 其具有提高的贮存稳定性，其中 R₃ 和 R₄ 均选自非环、单环和多环有机基团，这些有机基团可以任选被杂原子取代，且 R₃ 和 R₄ 可以任选连接在一起形成螺合到二噁丁环的环上的单环或多环基团，其中 R₂ 是一个选自苯基和萘基的芳基环，其可包含附加的取代基，其中 Z 是从卤素原子和具有 1-4 个碳原子的烷基中选出的，M 是从氢、碱金属离子、季铵或季磷离子中选出的，该方法包括以下几个步骤：

- 15 a) 具有下式的第一烯烃化合物与 Z 取代的丙二酸酯和一种碱反应，



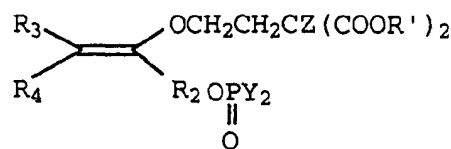
- 20 其中 RG 是一个可除去基团，生成具有下式的丙二酸酯取代的烯烃化合物，



其中 R' 是具有 1-4 个碳原子的烷基;

b) 丙二酸酯取代的烯烃与式为 $WP(O)Y_2$ 的磷酸化试剂反应, 其中 W 是从卤素中选出的, 而 Y 是一个卤素原子, 生成一个具有下式的磷酸化的烯

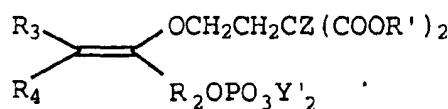
5 烃化合物:



;

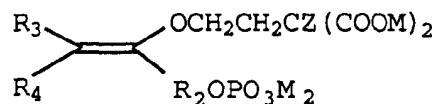
c) 磷酸化的烯烃化合物与式为 $Y'-OH$ 的羟基化合物反应, 其中 Y' 是从取代的或未取代的烷基中选出的, 生成具有下式的第二磷酸化的烯烃化

10 物:



和

d) 第二磷酸化的烯烃化合物在含有式为 $M-Q$ 的碱的水性溶剂中水解, 形成一个具有下式的烯烃盐化合物, 其中 Q 是一个碱性阴离子;



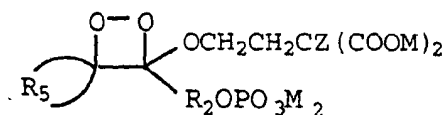
15

和

e) 在氧和烯烃盐化合物的水溶液存在下, 通过照射敏化剂使烯烃盐化合物发生光氧化反应, 形成二噁丁环盐化合物。

12. 权利要求 11 的方法, 其中 R_3 和 R_4 结合在一起形成单环或多环基团 R_5 , 其螺合到二噁丁环的环上, 该二噁丁环盐化合物具有下式:

20



其中 R_2 , M 和 Z 的定义如权利要求 1 所述。

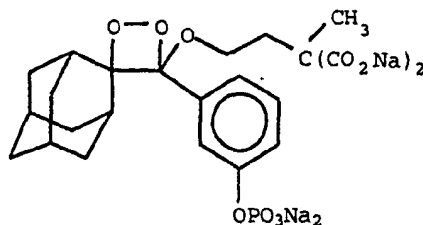
13. 权利要求 12 的方法, 其中 R_5 是一个取代的或未取代的金刚烷基团。

14. 权利要求 11 的方法, 其中 R_2 是一个取代的或未取代的间苯基。

25 15. 权利要求 11 的方法, 其中 Z 是从 F 和 CH_3 中选出的, 且 M 是 Na。

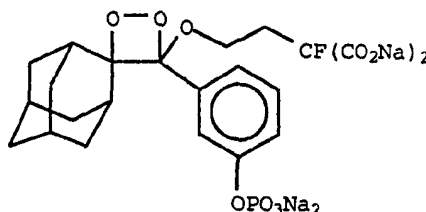
16. 权利要求 13 的方法, 其中 Z 是从 F 和 CH_3 中选出的, M 是 Na, R_2 是一个取代的或未取代的间苯基。

17. 权利要求 13 的方法, 其中 Z 是 CH_3 , R_2 是一个未取代的间苯基, R_5 是未取代的金刚烷基, 并且该二噁丁环盐化合物具有下式:



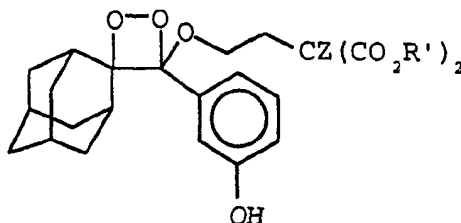
5

18. 权利要求 13 的方法, 其中 Z 是 F, R_2 是一个未取代的间苯基, R_5 是未取代的金刚烷基, 并且该二噁丁环盐化合物具有下式:



10

19. 一种具有下式的二噁丁环化合物,



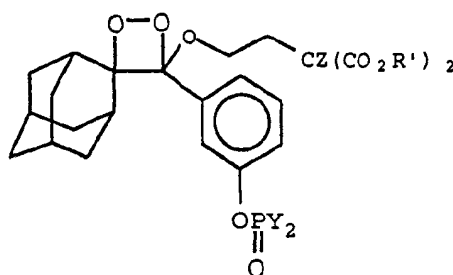
其中 Z 是从卤原子和具有 1-4 个碳原子的烷基中选出的, 每个 R' 均是一个含 1-4 个碳原子的烷基。

15

20. 权利要求 19 的化合物, 其中 Z 是 F, R' 是乙基。

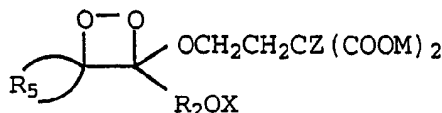
21. 权利要求 19 的化合物, 其中 Z 是 CH_3 , R' 是乙基。

22. 一种具有下式的二噁丁环化合物,



其中 Z 是从卤原子和含 1-4 个碳原子的烷基中选出的, 每个 R' 均是一个含 1-4 碳原子的烷基, 并且每个 Y 均是从 Cl 原子和 2-氟乙基中选出的。

- 5 23. 权利要求 22 的化合物, 其中 Z 是 F, Y 是 Cl, R' 是乙基。
 24. 权利要求 22 的化合物, 其中 Z 是 CH₃, Y 是 Cl, R' 是乙基。
 25. 权利要求 22 的化合物, 其中 Z 是 F, Y 是 2-氟乙基, R' 是乙基。
 26. 权利要求 22 的化合物, 其中 Z 是 CH₃, Y 是 2-氟乙基, R' 是乙基。
 27. 一种具有下式的二噁丁环,

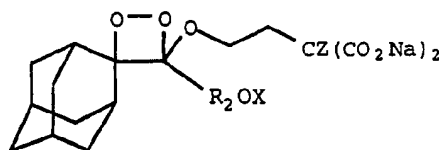


10

其具有提高的贮存稳定性, 式中: R₅ 选自单环和多环烷基, 其螺合到二噁丁环的环上且其含有 6-30 个碳原子, 同时它还能任选包括附加的取代基, R₂ 是一个选自苯基和萘基的芳环基, 其可以包括附加的选自卤素、烷基、取代烷基、烷氧基、取代烷氧基、羰基、羧基、氨基和烷基氨基的取代基, 其中 Z 是从氟原子和具有 1-4 个碳原子的烷基中选出的, M 是从氢, 碱金属离子或季铵或季磷离子中选出的, 并且 OX 基团选自 O⁻M⁺ 基团, OOCR₈ 基团, OPO₃²⁻ 盐、OSO₃⁻ 盐、β-D-半乳糖苷氧和 β-D-葡萄糖苷酸氧基团, 在 O⁻M⁺ 基团中, M 是从氢、碱金属离子、季铵或季磷离子中选出的, 在 OOCR₈ 基团中, R₈ 是从含有 2-8 个碳原子的烷基和芳基中选出的。

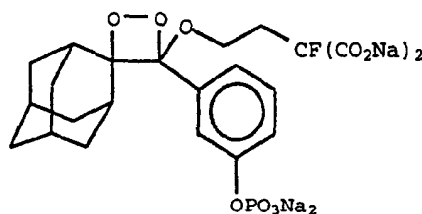
20

28. 权利要求 27 的二噁丁环, 其具有下式:



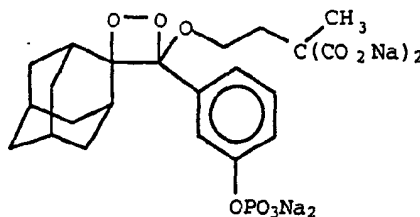
其中 R₂ 和 Z 的定义如权利要求 27 所述。

29. 权利要求 28 的二噁丁环, 其具有下式:



其具有提高的贮存稳定性。

30. 权利要求 28 的二噁丁环，其具有下式：

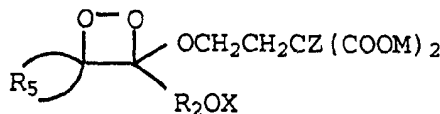


5

其具有提高的贮存稳定性。

31. 一种用来产生光的组合物，其在水溶液中包括：

(a) 一种具有下式的稳定的二噁丁环，



10

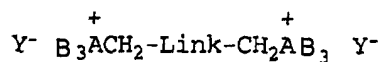
其具有提高的贮存稳定性，其中

R_5 选自含有 6-30 个碳原子的单环和多环烷基，其螺合到二噁丁环的环上，同时它还能任选包括附加的取代基，其中 R_2 是选自苯基和萘基的芳环基，其包括附加的选自卤素、烷基、取代烷基、烷氧基、取代烷氧基、羰基、羧基、氨基和烷基氨基的取代基，其中 Z 是从由氟原子和具有 1-4 个碳原子的烷基组成的组中选出的，M 是从氢、碱金属离子、季铵或季磷离子中选出的，并且 OX 基团选自 O^-M^+ 基团， $OO\text{CR}_8$ 基团， OPO_3^{2-} 盐、 OSO_3^- 盐、 β -D-半乳糖苷氧和 β -D-葡萄糖苷酸氧基团，在 O^-M^+ 基团中，M 是从氢、碱金属离子、季铵或季磷离子中选出的，在 $OO\text{CR}_8$ 基团中， R_8 是从含有 2-8 个碳原子的烷基和芳基中选出的；和

20

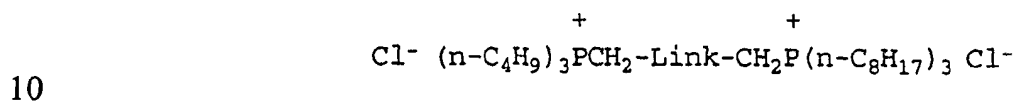
(b) 一种非聚合的阳离子增强剂物质，与不存在增强剂的情况相比，它可以提高二噁丁环与活化剂反应所产生的光量。

32. 权利要求 31 的组合物，其中增强剂物质是下式的二阳离子表面活性剂，



- 其中每个 A 均是独立地从由 P 和 N 原子组成的组中选出的, 其中 Link 是含有至少两个碳原子的有机连接基团, 它是从由取代和未取代的芳基、烷基、链烯基、炔基组成的组中选出的, 且其中的连接基团能任选包含杂原子, B 是从含有 1-20 个碳原子的低级烷基或芳烷基中选出的, Y 是一个阴离子。

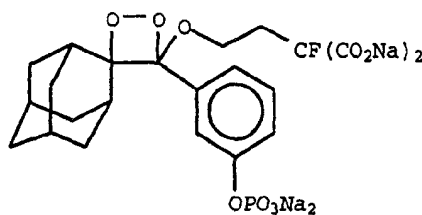
33. 权利要求 32 的组合物, 其中增强剂物质是具有下式的二阳离子表面活性剂,



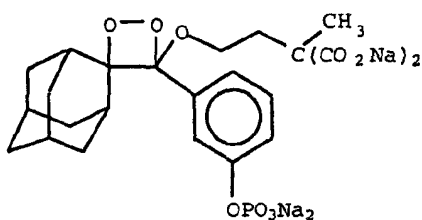
其中 Link 是亚苯基。

34. 权利要求 31 的组合物, 其中 R_5 是从金刚烷基和取代的金刚烷基中选出的。

35. 权利要求 31 的组合物, 其中二噁丁环具有下式:



36. 权利要求 31 的组合物, 其中二噁丁环具有下式:



具有增强贮存稳定性的水溶性的

三取代 1,2 - 二噁丁环, 合成

5 方法以及中间产品

关于相关申请的交叉参考

本申请是申请人 1996 年 11 月 8 日申请的同时待审的美国申请顺序号 08/748,107 的部分继续申请, 而这一申请又是申请人 1995 年 7 月 31 日申请的同时待审的美国申请顺序号 08/509,305 的部分继续申请。

发明背景

(1)发明领域

本发明一般地描述了能被包括酶在内的化学试剂触发, 以产生化学发光的稳定的 1,2 - 二噁丁环(dioxetanes)和组合物。二噁丁环包括一个以上的是烷氧取代基一部分的电离基团。该二噁丁环还包括一个取代了烷氧取代基上一个氢原子的氟原子或低级烷基, 其可改进二噁丁环的贮存稳定性。特别是本发明还涉及这种二噁丁环的合成方法。

根据本发明合成方法制备的二噁丁环可用在包括二噁丁环、一种阳离子表面活性剂和一种任选的可提高所产生化学发光量的荧光增白剂的组合物中。本发明的二噁丁环和增强组合物可用在发光(化学发光)方法和检测被分析物存在和数量的分析方法中。重要的是可电离基团提供了一种更溶于水的二噁丁环, 解决了胶囊(capsule)化学分析系统中意想不到的化学携带问题, 在此同时, 氟原子和低级烷基的存在改善了二噁丁环的贮存稳定性。

(2)相关技术的描述

25 a. 酶催触发的二噁丁环

最早的酶触发二噁丁环的实例叙述在美国专利申请(A.P.Schaap, 美国专利申请顺序号 887,139)和一系列论文中(A. P. Schaap, R. S. Handley 和 B.P.Giri, 《四面体通讯》 935 (1987); A. P. Schaap, M. D. Sandison 和 R.S.Handley, 《四面体通讯》 1159 (1987)和 A. P. Shcaap, 《光化学、光生物学》 47S, 50S (1988))。在高度稳定的金刚烷基取代的二噁丁环上承载有被保护的芳醚取代基, 该二噁丁环在酶和水性缓冲剂的作用下触发分解, 同时

发射光, 给出强烈贡献电子的芳醚阴离子, 这种芳醚阴离子可显著增加二噁丁环的分解速率。结果在几个数量级的强度上产生化学发光, 这是由被保护形式的二噁丁环的缓慢热分解引起的。在授予 Schaap 的美国专利 5,068,339 中公开了有共价键连接的荧光增白剂基团的酶触发的二噁丁环, 其分解的结果为通过能量向荧光增白剂的转移而增强了化学发光。Bronstein 的美国专利 5,112,960、5,220,005 和 PCT 申请(WO 88/00695)公开了承载取代金刚烷基的可触发的二噁丁环。Edwards 的美国专利 4,952,707 中公开了磷酸酯盐取代的二噁丁环。Bronstein 的 PCT 申请(WO 94/26726)中公开了承载苯基或萘基的金刚烷基二噁丁环, 在苯基和萘基的非共轭位置上取代有不稳定的 OX 基团, 并且在芳环上还有另外的基团。

其它可触发的二噁丁环公开在 Wang 的 PCT 申请(WO 94/10258)中。在 Wang 公开的二噁丁环中包括一个可以是单取代的烷氧基和一个取代的苯基 - OX 基团, 其中除可触发的 OX 基团外, 苯环取代基上还存在于一个或多个非氢基团。

所有前述出版物中公开的二噁丁环均产生一种发光的羰基化合物, 包括芳香羧酸的烷基酯, 通常是羟基苯甲酸甲酯或羟基萘甲酸甲酯, 或者羟基芳基酮。

申请人在于 1995 年 7 月 31 日申请的同时待审的美国专利申请顺序号 08/509,305('305 申请)中, 公开了二取代的二噁丁环, 其中的羟基二噁丁环显示有增强的水溶性, 本发明引入其全部作为参考。

b. 由于可触发二噁丁环的化学发光的表面活性剂增强

在水溶性物质(包括铵表面活性剂和一种荧光增白剂)的存在下, 由于酶触发分解稳定的 1,2 - 二噁丁环而引起的化学发光的增强已经有报道了 (A.P.Schaap, H.Akhavan 和 L.J.Romano, Clin.Chem., 35(9), 1863(1989))。由溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)和 5 - (N - 十四酰) - 氨基荧光素组成的荧光胶束在胶束疏水的环境中, 借助于能量从阴离子形式的激发态酯到荧光素化合物的有效转移, 俘获中间产品羟基取代的二噁丁环, 并导致化学发光量子产额增加了 400 倍。

在美国专利 4,959,182 和 5,004,565 中, Schaap 描述了另外的实例, 即在季铵表面活性剂 CTAB 形成的胶束的存在下, 由于稳定的二噁丁环的化学和酶触发而导致化学发光增强。荧光性胶束也增强了羟基和乙酸基取代二噁

丁环的碱触发分解的发光。

在美国专利 5,145,772 中, Voyta 公开了 1,2 - 二噁丁环在只有侧季铵基团或混有荧光素的聚合物存在下, 酶催化所产生的化学发光的增强。已报道的其它增强化学发光的物质包括球状蛋白质, 如牛血清清蛋白和季铵表面活性剂。其它的阳离子聚合物在一定程度上可有效用作化学发光增强剂; 非离子聚合物通常没有有效性, 而阴离子聚合物则显著地减少了光的发射。Bronstein 在 PCT 申请(WO 94/21821)中描述了前述聚合的季铵表面活性剂增强剂和增强型添加剂混合物的使用。

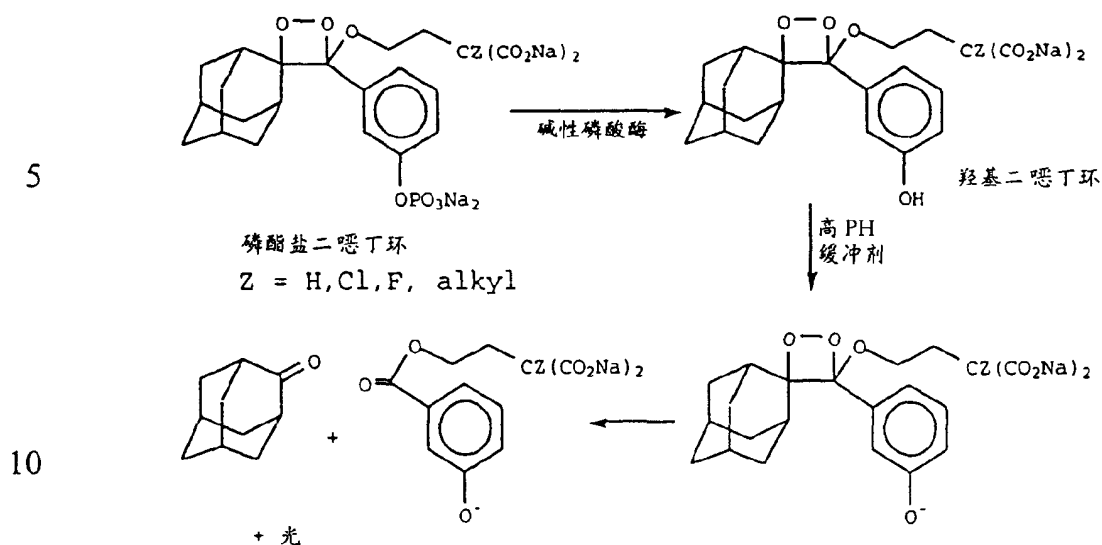
在 CTAB 的存在下, 由羟基芘磺酸(pyranine)引起的非触发二噁丁环的增强和催化现象已有描述(Martin Josso, 博士论文, Wayne 州立大学(1992) Diss. Abs. Int., Vol.53, No.12B, p.6305)。

在 Akhavan - Tafti 的美国专利 5,393,469 中, 公开了 1,2 - 二噁丁环在任由荧光性能量接受体取代的聚合季磷盐的存在下, 酶催化所产生的化学发光的增强。

在欧洲专利申请顺序号 94108100.2 中公开了 1,2 - 二噁丁环在双阳离子磷盐的存在下酶催化所产生化学发光的增强。没有文件公开过阴离子荧光增高剂和可提高触发二噁丁环化学发光的双阳离子增强剂的组合体。也没有报道过本发明类型的增强型取代二噁丁环实例。

c. 具有改进水溶性的可触发的二噁丁环

酶催化触发的二噁丁环目前已在众多应用中广泛用作标记酶的基质, 这些应用包括免疫测定法, 基因表达研究, 西式吸印(Western blotting), 南式吸印(Southern blotting), DNA 序列和病原体中核酸节段的鉴定。尽管这些化合物的用途仍在增长, 但在一些测定方法中的使用仍有一些限制。期望的是可触发二噁丁环中脱保护形式的羟基二噁丁环更溶于水。如下列结构式所示, 特别理想的是通过碱性磷酸酶使磷酸酯盐二噁丁环脱磷酸而形成的羟基二噁丁环在水溶液和含化学发光增强物质的水溶液中高度溶解。这种二噁丁环和组合物在用于检测水解酶或水解酶共轭物的某种溶液测定法中非常重要。



在本发明深层背景和下述更详细解释的实例中，可以发现根据胶囊化学分析原则在自动检测仪上进行的测定中，常见化学发光的二噁丁环试剂使用的结果是试剂从一流体段携带到另一流体段，最终结果是潜在的测量不准确、错误的结果和由于不可再现而带来的不准确性。胶囊化学分析叙述在美国专利 5,399,497 中，本发明引入其全部作为参考。已假定在其它可能克服携带的方法中，特别是具有增强水溶性的羟基二噁丁环可能会消除或者使这种发光的反应中间体向胶囊化学分析系统中相邻流体段的携带最小化。

工业用的二噁丁环化合物中没有在烷氧基上引入增溶基团。这样，这些二噁丁环在需要零携带的测定方法中是不适用的。在美国专利 5,220,005 中曾建议向二噁丁环中引入增溶基团。在金刚烷取代基上取代有羧基的二噁丁环已经要求(claim)过，但是还没有有关这种二噁丁环制备的描述。重要的是，没有公开过加入羧基后在二噁丁环的溶解性和其它特性方面的效果(如果有)。而且在本领域内没有任何有关需要多少个增溶基团或者可能有怎样特殊的优点的学说。如果增溶基团的使用干扰了引发光发射的保护基团的除去，或者在另一方面干扰了光的产生，则这种增溶基团的使用是没有任何价值的。同样地，如果增溶基团会在发光反应中被除去，则这样的增溶基团也是没有用的。

在申请人同时待审的'305 申请中，已证明引入一个离子增溶基团不足以消除由磷酸酯盐二噁丁环脱磷酸而产生的羟基二噁丁环有关的携带问题。磷

酯盐二噁丁环的羟基二噁丁环产品是高度水溶性的，因此提供含这种磷酸酯盐二噁丁环的增强型组合物来解决这个问题。接下来发现提供携带问题解决方案的二噁丁环在室温下的储存稳定性不足。因此本领域内任何已知的二噁丁环均不能同时拥有羟基二噁丁环的高度溶解性和长期的储存稳定性。

- 5 申请人在 08/748,107 中公开了用氟原子或低级烷基取代承载两个离子增溶基团的烷氧基团上的氢原子，可显著改善这些二噁丁环的储存稳定性。制备这种二噁丁环的合成方法也已公开。在本申请中，公开了改进的方法及所用的中间产品。

发明目的

- 10 本发明的一个目的是提供一种酶触发的具有改进储存稳定性的 1,2 - 二噁丁环，它的羟基二噁丁环产物由触发酶作用形成，在水溶液中高度溶解。本发明的第二个目的是提供的二噁丁环取代有两个或更多个增加水溶性的离子基团，并且在二噁丁环结构的烷氧取代基上排列有氟原子或低级烷基，其可提供优越储存稳定性。
- 15 本发明的又一目的是提供包含二噁丁环，一种非聚合阳离子增强剂和任选的一种荧光增白剂的组合物，用来提供强化学发光，其中的二噁丁环为氟原子或低级烷基取代的，并带有两个或多个增加水溶性的离子基团。本发明的再一目的是提供的二噁丁环和组合物在用于在胶囊化学分析系统上使用的测试法中时，可消除试剂携带问题并具有持久的储存稳定性。
- 20 本发明还有一个目的是提供一种合成方法和在制备取代有两个或多个水增加水溶性的离子基团，并且在二噁丁环结构上的烷氧取代基上排列有氟原子或低级烷基的 1,2 - 二噁丁环中所用的中间体。

附图说明

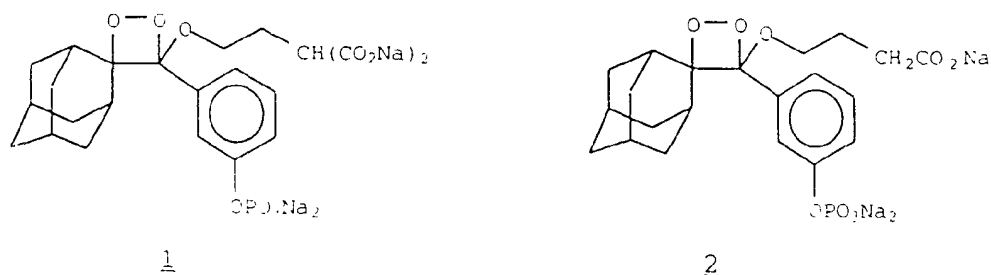
- 图 1：是一个胶囊化学分析系统的图解，其中确定携带是一个问题。
- 25 图 2：是一个在胶囊化学分析系统中相邻段的分布图(profile)，显示了由于携带而观测到的发光，这在下面实施例中将更全面地描述。
- 图 3：在实验中观测到的相邻段的另一分布图，其将在下面实施例中详细叙述，经确认携带不是光学性的。
- 图 4：在实验中观测到的相邻段又一分布图，其会在下面的实施例中详细叙述，经确认携带的实质是化学性的。
- 30 图 5：描绘在 25 °C 时氟代二噁丁环、氯代二噁丁环、甲基取代二噁丁

环和一个不含卤素的参考二噁丁环分解相对速率的曲线图。

优选实施方案的描述

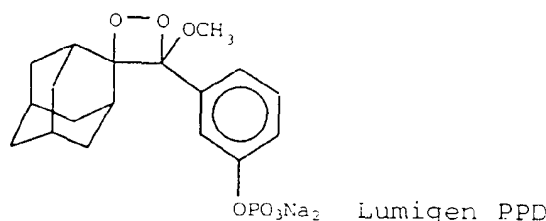
本发明涉及具有提高贮存稳定性的二噁丁环，其羟基二噁丁环产物是由触发酶作用形成的，它在水溶液中是高度溶解的，并且它是由酶触发产生化学发光的。在美国专利 5,399,497 中描述了，这种可触发的二噁丁环在胶囊化学分析系统中消除或者最小化了发光的羟基二噁丁环向相邻段的携带。携带能由低水溶性发光材料的增溶作用、沉积或沉降作用从而进入在胶囊化学系统中起隔离流体作用的碳氟油中引起。试剂携带会导致不精确的测量，错误的结果和由于不可重复性而导致误差。

在同时待审的'305 申请中指出，下式的二噁丁环 1 在水溶液中碱性磷酸酶的化学发光的检测中非常有效。



作为比较，制备了只引入一个可电离基团的二噁丁环 2。这种二噁丁环不会消除上述讨论的携带问题。

在美国专利 5,399,497 中描述的测试系统中，二噁丁环 1 的使用会导致携带问题的完全消除。但是，接下来意想不到的发现：在水缓冲剂中的二噁丁环 1 溶液表现出不理想的贮存稳定性，在碱性缓冲剂中含二噁丁环 1 的溶液，在 25 °C 贮存两星期后，显著分解。实际上，发现二噁丁环 1 的稳定性明显低于有关的化合物，如下示的 Lumigen PPD，其在烷氧基上没有离子增溶基团。



据申请人目前所知，在二噁丁烷化学领域中没有任何学说可以解释 1 式较低稳定性的原因。在结构上改进 1，改善其储存稳定性，同时保留它其它有益

特性的方法披露于申请人同时待审的申请顺序号 08/748,107 中。本发明引入其全部作为参考。

定义

贮存稳定性是指由于自发反应而产生的二噁丁环的分解速率，其是一个固有的性质。可触发的二噁丁环的分解，也可由痕量试剂的存在而引起，这种试剂可催化除去保护基团，从而引发分解。二噁丁环的贮存稳定性可以通过在定期的时间间隔测定存在于已知样品中的二噁丁环的量来估计。测量可采取任意已知的形式，其测定了与二噁丁环量有关的性质。典型的技术如分光光度测定法、NMR 光谱测定法及类似的技术。测定所产生光量的常见方式为将已知量的二噁丁环与一种触发剂在一组标准条件下反应而得。

贮存稳定性是指以纯品形式和作为缓冲溶液中溶液或配方的二噁丁环的稳定性。该配方中还能包括可提高产生光量或可改善酶触发剂活性的各种添加剂。所期望的是，配方中的二噁丁环，在外界温度下，经历一段适当的时间没有发生明显的分解。用于自动分析仪的组合物理想的是应稳定存在至少一个星期。当在 0 - 5 °C 时冷藏时，期望至少在 2 - 3 月内观测不到明显的分解。更理想的是，用于自动分析仪的组合物在大约 2 - 4 周内应该表现出不超过 2 - 3 % 的变化，这种变化通过贮存稳定性的指示器观测。

已发现贮存稳定性问题在具有式 I 的二噁丁环中得到了解决，

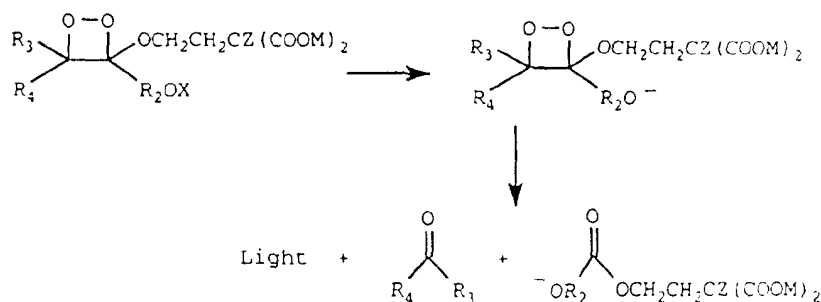


I

其中 Z 选自氟原子和有 1 - 4 个碳原子的烷基，M 是从氢原子，碱金属离子或季铵或磷离子中选出的；其中 R₃ 和 R₄ 都是从无环的、单环的和多环的有机基团中选出，这些基团可以被杂原子任意地取代，并且为二噁丁环提供稳定性；其中的 R₂ 是选自苯基或萘基的芳环基团，其可以包括另外的选自卤素、烷基、取代烷基、烷氧基、取代烷氧基、羰基、羧基、氨基和烷基氨基的取代基；其中的 X 是一保护基，其能被活化剂除去形成一个氧阴离子取代的二噁丁环，该二噁丁环分解并产生光和两个含羰基的化合物，其中一个含两个羧酸盐基团的氧阴离子取代酯化合物，如下所示：

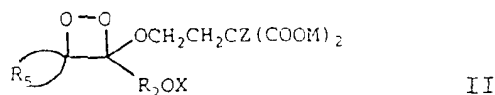
30

5

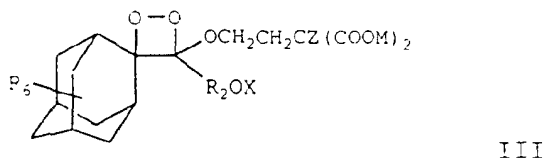


当 M 是 H 时, 认为相应的二噁丁环化合物将优选只在一定的 pH 条件下使用, 此时羧酸官能团是电离的, 即 pH 约 ≥ 7 。优选 M 是碱金属离子, 最优选是钠离子。

- 在另一实施方案中, R_3 和 R_4 基团结合在一起形成单环或多环烷基 R_5 ,
 10 R_5 含 6 - 30 个碳原子并螺合到二噁丁环的环上, 其可提供热稳定性且能包含另外的非氢取代基。

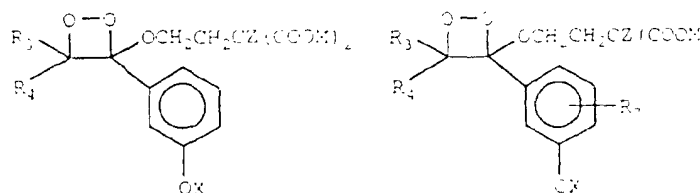


- 基团 R_5 更优选为多环基团, 优选是金刚烷基或是有一个或多个取代基
 15 R_6 的金刚烷基, 以共价键结合的取代基 R_6 选自卤素、烷基、取代烷基、烷氧基、取代烷氧基、羰基、羧基、苯基、取代苯基、氨基和烷基氨基。

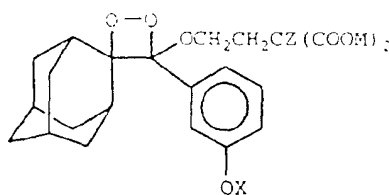


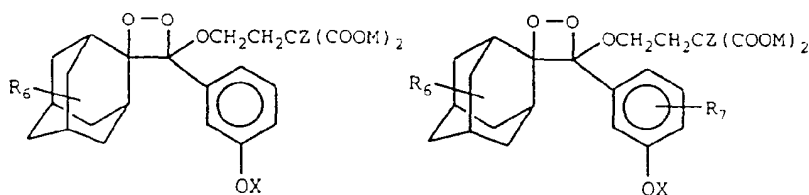
- 20 在另一个优选实施方案中, 基团 R_2 是苯基或萘基。尤其优选 R_2 是苯基, 其中 OX 基定位于二噁丁环基的间位上, 如下所示。苯环还可以包含另外的环取代基 R_7 , R_7 可以独立地从卤素、烷基、取代烷基、烷氧基、取代烷氧基、羰基、羧基、氨基和烷基氨基中选出。一些典型的结构如图示:

25

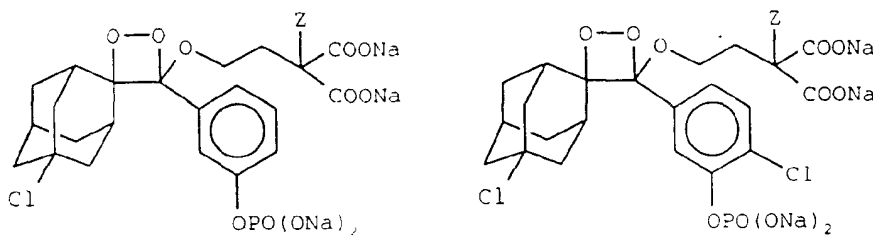


30





后面两种结构式的化合物中, 如下所示 R_6 为 H 或 Cl, R_7 为 Cl 的化合物被认为是更优选的化合物。

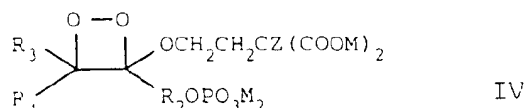


10

OX 基团的性质受检测中使用的触发剂支配, 可选自羟基、 O^-M^+ 基(其中 M 从氢原子、碱金属离子或季铵或磷离子中选出)、 $OOCR_8$ (其中 R_8 是从包括 1 - 8 个碳原子和可任意地含杂原子的烷基和芳香基团中选择)、 OPO_3^{2-} 盐、 OSO_3^- 盐、 β - D - 半乳糖苷氧(galactosidoxy)和 β - D - 葡萄糖苷酸基氧基团。OX 基团优选是 OPO_3^{2-} 盐基团。

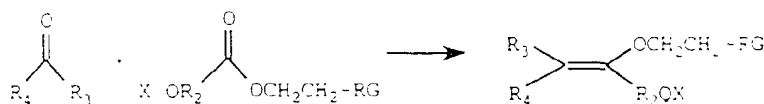
15

本发明的二噁丁环具有下式:



其中 R_2 、 R_3 、 R_4 、M 和 Z 如前文所述, 其能用申请人同时待审的申请号 08/748,107 中所述的方法和二噁丁环化学领域中已知的其它方法制备。例如, 具有下式的酮和酯(其中, RG 是一个可替换的原子或基团, X'也是一可替换的原子或基团如氢、烷基或三甲基甲硅烷基), 可以通过低价钛试剂偶合而生成一种乙烯基醚中间体。可除去的基团包括离去基团, 如选自 Cl、Br 和 I 的卤素原子、硫酸盐、磺酸盐如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐和 triflates(三氟磺酸盐)、季铵基团和叠氮化物。

25



这种乙烯基醚中间体在一步或更多步过程中转化成前体乙烯基醚磷酸盐。为合成的方便, 期望的是一个可除去基团用另一个可除去基团代替。基团 RG 是通过与 Z 取代的丙二酸酯反应和随后的酯基团的皂化反应而被 $CZ(COOM)$ 代替。在 X'和 X 基团不相同的情况下, 通过除去 X'并与具有添

30

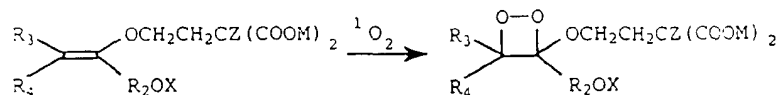
加 X 基团或保护形式的 X 基团的试剂反应，基团 X' 转化为 X 基团。例如，当 X' 是 H，X 是 PO_3Na_2 时，经过碱处理以脱质子，接下来与磷酸化试剂反应，产生一个磷酸三酯保护的乙烯基醚，它可以通过三酯转化为二钠盐的水解作用而转化成磷酸酯盐。在这个多步过程中，两个或多个操作可能会发生在

5 同一个操作步骤中，例如：羧酸酯和磷酸酯的水解同在一个步骤实施。



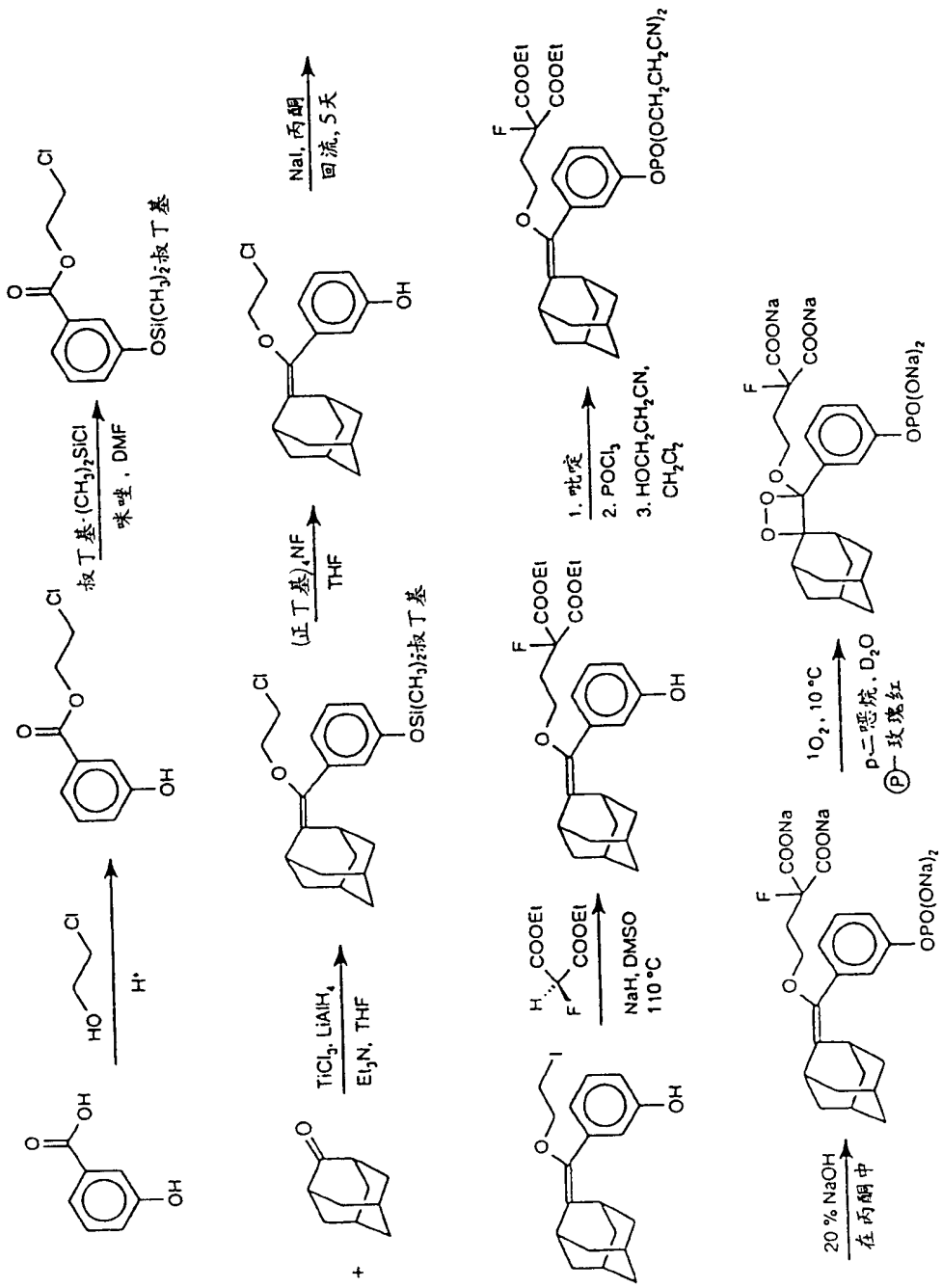
前体乙烯基醚磷酸酯盐通过已知的反应，直接转化成二噁丁环。已知反应包括，例如添加由染料敏化作用产生的单态氧。

10

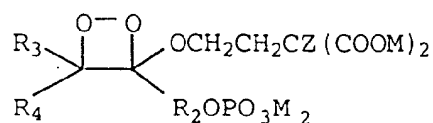


在下述具体实例中，通过图解的方式，举例说明了每一个过程。尤其是，流程图 1 根据前文所述步骤制备二噁丁环 3-5 的合成路线的流程，其公开和体现在前述 748,107 申请中。

流程图 1



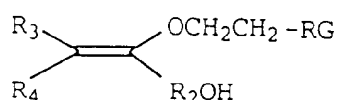
本发明优选的实施方案涉及制备式 IV 的二噁丁环盐化合物的过程,



- 式 IV 化合物具有提高的贮存稳定性, 其中 R_3 和 R_4 每一个都是从无环、单环和多环的有机基团中选出的, 这些有机基团可任意地被杂原子取代, R_3 和 R_4 可以任意地连接在一起形成单环或多环的基团, 螺合到二噁丁环的环上, 其中的 R_2 是从能包含附加取代基的苯基或萘基中选出的芳环基, 其中的 Z 是从由卤素原子和 1 - 4 个碳原子的烷基中组成的组中选出的, 而 M 则是从氢、碱金属原子或季铵或磷离子选出的, 该制备过程包括下列步骤:

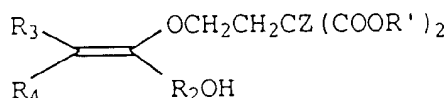
a) 将具有下式的第一烯烃化合物, 其中 RG 是可除去基团,

10



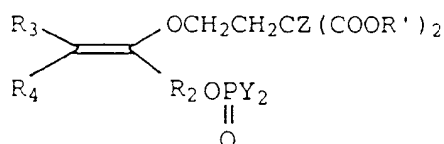
与 Z 取代的丙二酸酯和一种碱反应, 给出具有下式的丙二酸酯取代的烯烃化合物, 其中 R' 是有 1 - 4 个碳的烷基;

15



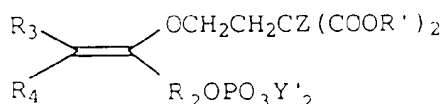
b) 将该丙二酸酯取代的烯烃与式为 $\text{WP}(\text{O})\text{Y}_2$ 的磷酸化试剂反应, 其中的 W 和 Y 均可以是卤素原子, 形成具有下式的磷酸化的烯烃化合物;

20



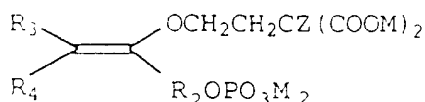
c) 将此磷酸化的烯烃化合物与式为 $\text{Y}'\text{-OH}$ 的羟基化合物反应, 其中 Y' 选自取代或未取代的烷基, 形成具有下式的第二磷酸化的烯烃化合物;

25



d) 在水性溶剂中, 在一种式为 M-Q 的碱的存在下, 其中 Q 是碱性阴离子, 水解第二磷酸化的烯烃化合物, 形成具有下式的烯烃盐化合物; 和

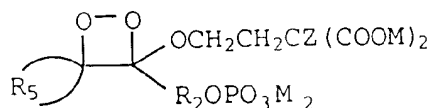
30



e) 在氧和烯烃盐化合物水溶液的存在下, 通过照射一种光敏剂从而将该烯烃盐化合物光氧化, 形成二噁丁环盐化合物。

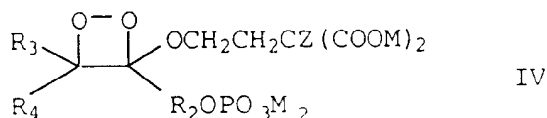
更优选使用这种方法制备的二噁丁环中, R_3 和 R_4 结合在一起形成单环或多环基团 R_5 , 并且 R_5 螺合到二噁丁环的环上, 则二噁丁环盐化合物具有

5 下式:



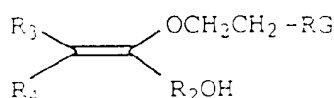
在其它优选的方法中, 基团 R_2 是间苯基, Z 是卤素或有 1 - 4 个碳原子的烷基, 更优选 Z 是 F 或 CH_3 , 且 M 是碱金属离子, 更优选 M 是 Na。

目前已发现具有增强储存稳定性的式 IV 化合物能通过包括下列步骤的

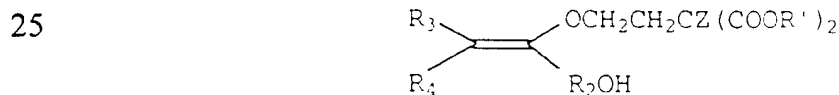


15 改进方法而有利地制备出。其中 R_3 和 R_4 均可选自无环、单环和多环的有机基团, 这些有机基团能任选地由杂原子取代, 且 R_3 和 R_4 能任选地连在一起形成单环或多环基团并螺合到二噁丁环的环上, 其中 R_2 是芳环基团, 选自能包括附加取代基的苯基或萘基, 其中 Z 选自卤素原子和有 1 - 4 个碳原子的烷基, 且 M 选自氢、碱金属离子或季铵或磷离子。

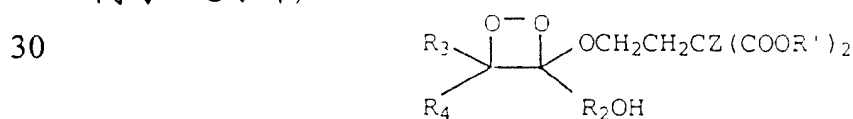
20 a) 将具有下式的第一烯烃化合物, 其中 RG 是可除去基团,



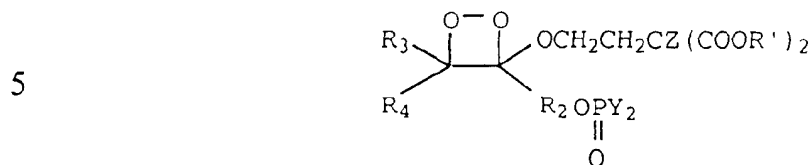
与 Z 取代的丙二酸酯和一种碱反应, 给出具有下式的丙二酸酯取代的烯烃化合物, 其中 R' 是有 1 - 4 个碳原子的烷基;



b) 在氧和丙二酸酯取代的烯烃化合物的存在下, 通过照射一种光敏剂, 从而将丙二酸酯取代的烯烃化合物光氧化, 形成具有下式的丙二酸酯取代的二噁丁环;

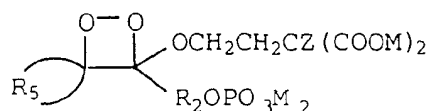


c) 将丙二酸酯取代的二噁丁环与具有式 $WP(O)Y_2$ 的磷酸化试剂反应, 其中 W 选自卤素, Y 选自卤素原子、取代或未取代的烷氧基、芳氧基、芳烷氧基和三烷基甲硅烷氧基, 形成具有下式的磷酸化的二噁丁环化合物; 和



d) 将水溶液中的磷酸化的二噁丁环, 在一种式为 M - Q 碱的存在下水解, 其中 Q 是碱性阴离子, 形成二噁丁环盐化合物。

更优选的是使用这种方法制备的二噁丁环中, R_3 和 R_4 结合在一起形成一个单环或多环基团 R_5 并螺合到二噁丁环的环上, 并且其能包含附加的取代基, 该二噁丁环盐具有下式:



15 在其它优选的实施方案中, 该方法被用来制备一种二噁丁环, 其中 R_2 基团是能包含附加取代基的间位苯基, Z 是卤素原子或具有 1 - 4 个碳原子的烷基, 更优选 Z 是 F 或 CH_3 , M 是一种碱金属离子, 更优选是 Na。

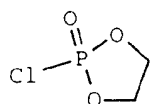
第一烯烃化合物与 Z 取代的丙二酸酯 $CHZ(COOR')_2$ 和一种碱反应, 生成丙二酸酯取代的烯烃化合物的这一步通常是在极性的非质子溶剂如 DMSO、DMF、N - N 二甲基乙酰胺, N - 甲基吡咯烷酮(Pyrollidone)中, 使用一种弱亲核碱, 优选氢氧化钠或氢氧化钾而进行的。该反应通常是在提高温度减少反应时间的情况下进行, 反应一般在 50 - 150 °C 之间, 更普遍地是在 80 - 120 °C 之间进行可除去的基团包括离去基团, 如选自 Cl、Br 和 I 的卤素、硫酸盐、如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐和 triflate(三氟磺酸盐)的磺酸盐、季铵基团和叠氮化物。

25 在所述改进方法中, 用在中间产品丙二酸酯取代的烯烃上进行光氧化这一步代替了为总体方法中的最终步骤的光氧化磷酸酯盐烯烃这一步(其叙述在申请 748,107 中)。在这一步中, 承载苯酚基团的丙二酸酯取代的烯烃化合物溶解在有机溶剂中, 在氧与敏化剂存在下经照射, 形成丙二酸酯取代的二噁丁环。用光, 通常为可见光, 照射敏化剂和氧, 产生了单态氧, 这种单态氧与丙二酸酯取代烯烃的乙烯醚型双键反应。敏化剂可以溶解在溶剂中, 或者优

选固定在本领域公知的一种聚合物颗粒上。用于产生单态氧敏化剂包括, 但不限制为, 玫瑰红(四氯四碘荧光素)、亚甲蓝、曙红(四溴荧光素)、四苯基卟啉(TPP)、 TPP 的金属配合物(特别是锌和锰)和 C_{60} 。优选的有机溶剂包括如 CH_2Cl_2 、 $CHCl_3$ 和 CCl_4 的卤化碳、氟化卤化碳, 低分子量的酮和它们的氟化类似物, 脂肪烃和芳香烃及其氟化同类物。最优选的是 CH_2Cl_2 。在有机溶剂中进行光氧化作用, 有利地提供了一种反应介质, 在这种反应介质中单态氧的生存期被最大化。这对减少反应时间和使光氧化更容易完成起到了明显的效果。同样也促进了产品分离, 在大多数情况下只需要简单地过滤敏化剂和蒸发溶剂即可。

10 丙二酸酯取代的二噁丁环与式 $WP(O)Y_2$ 的磷酸化试剂反应(其中 W 是从卤素中选出的, Y 是从卤素原子、取代的或未取代的烷基氧和三烷基甲硅烷基氧基团中选出的), 生成磷酸化的二噁丁环化合物的这步反应是在一种有机溶剂, 优选如 CH_2Cl_2 或 $CHCl_3$ 的卤化碳, 或如二乙基醚或四氢呋喃(THF)的醚中, 在一种胺碱的存在下实施的。有用的胺碱包括(并不限于)吡啶和三乙胺。当 Y 是取代的或未取代的烷氧基, 芳氧基, 芳烷氧基或三烷基甲硅烷基氧基团时, 具有代表性的 Y 基团包括, 借助于实施例, 如 OCH_3 、 OCH_2CH_3 和诸如此类的烷氧基、如氯乙氧基(OCH_2CH_2N), 或三甲基甲硅烷基乙氧基 $OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$ 的取代烷氧基, 苯氧基, 取代苯氧基, 苄氧基、三甲基甲硅烷基氧和其它一些普通有机化学工作者熟知的化合物。也能将两个基团 Y

15 连接在一起成为单个基团。如出现在试剂

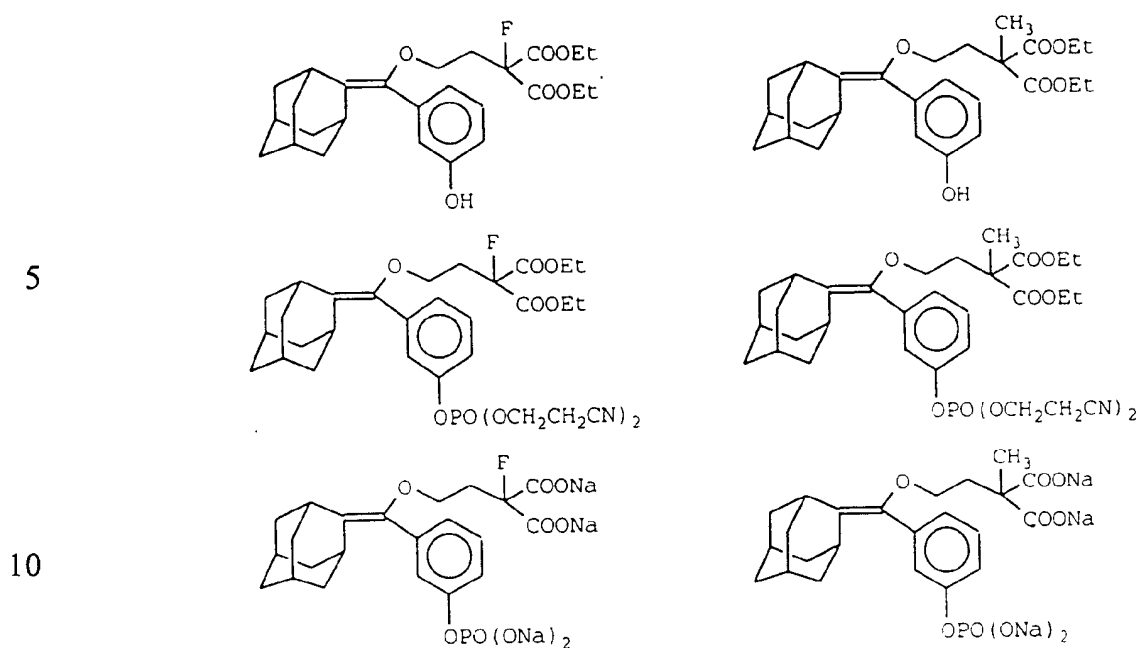


中的亚乙二氧基。优选基团 Y 是氯乙氧基。在更优选的实施方案中, Y 是卤素, 优选 Y 和 W 都是 Cl。

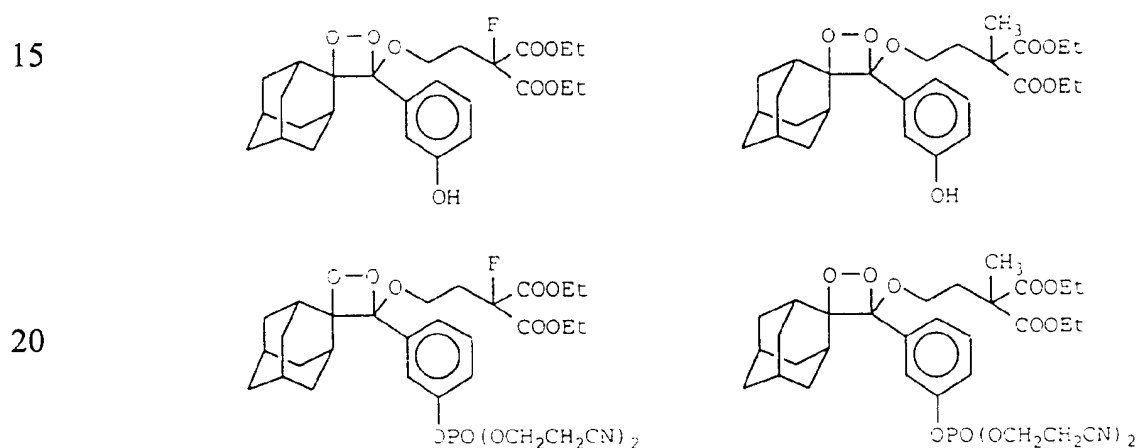
25 磷酸化作用步骤是在从 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下在溶液中进行的。大约 $0 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度是非常有利的。磷酸化试剂 $WP(O)Y_2$ 以一种可控方式加入, 以免引起反应溶液变热。磷酸化试剂在加入过程中最好与胺碱同时加入, 胺碱优选是吡啶。

水解或去保护作用步骤伴随有在具有碱的水性溶剂中水解磷酸化的二噁丁环, 碱式为 $M - Q$, 其中 Q 是碱性阴离子, 其量足以除去保护基团 Y 和 R' , 形成二噁丁环盐的化合物。溶剂可包括水、水性缓冲剂以及水和一种

30

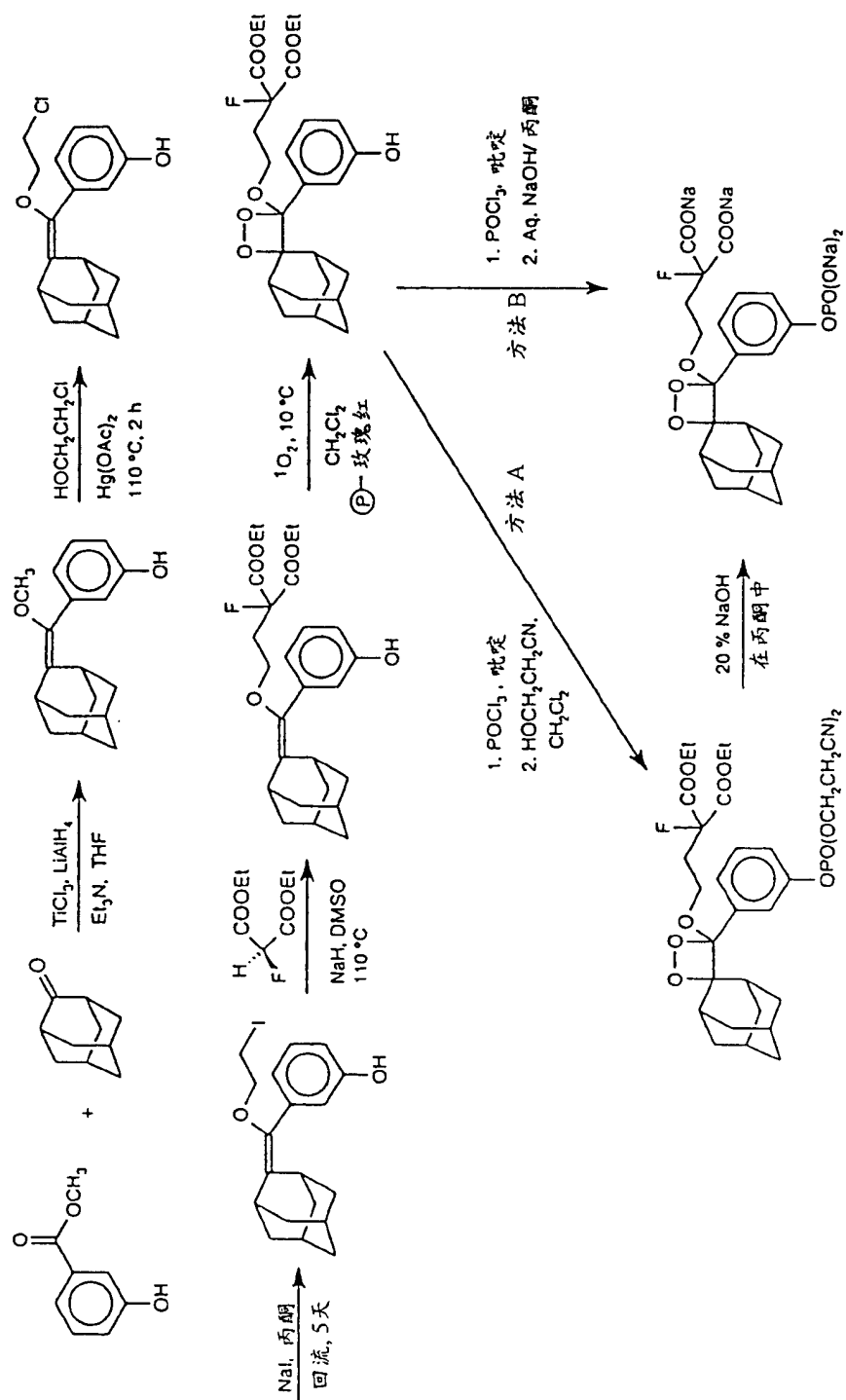


另外，在制备本二噁丁环化合物中，下面一些新的二噁丁环化合物作为合成中间体是有很有用的。

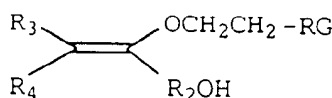


本发明根据改进方法合成二噁丁环的典型方法示于流程图 2 中。

流程图 2



在前述合成过程中提到的起始原料(前体烯烃)具有如下的结构, 其可以通过本领域内已知的方法制备,

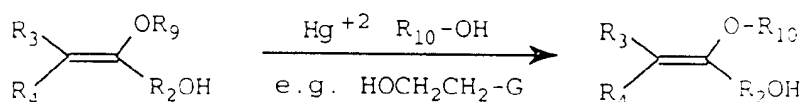


5

其中 RG 是可除去基团。正如在美国专利 4,983,779 和 4,982,192 中描述的一个方法, 乙烯基醚官能团是通过酮 $\text{R}_3\text{R}_4\text{C} = \text{O}$ 和酯 $\text{HOR}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2 - \text{G}$ 在钛催化剂作用下偶合来制备的, 其中 G 可以是与 RG 相同的, 或者可以被 RG 替换或转化成 RG 的基团。在下文中提供了一典型的合成过程, 其中 RG 为碘原子, G 为氯原子。进一步认识到, 为了方便起见, 偶合反应的酯组分可以使用保护形式, 在这种形式中羟基是以掩蔽的形式出现, 如甲硅烷基醚或烷基醚的形式。在偶合反应之后, 使用标准的合成手段释出游离的羟基。

申请人进一步发现, 这些前体烯烃同样可以通过一种新的, 以前未报导过的过程制备这种类型乙烯基醚的方法制备。前述的钛催化的方法需要制备承载 G 或 RG 基团的单独的酯化合物, 增加了附加的复杂性和花费, 而新方法则使用一种可从市售的起始原料制备的普通的乙烯基醚中间体。

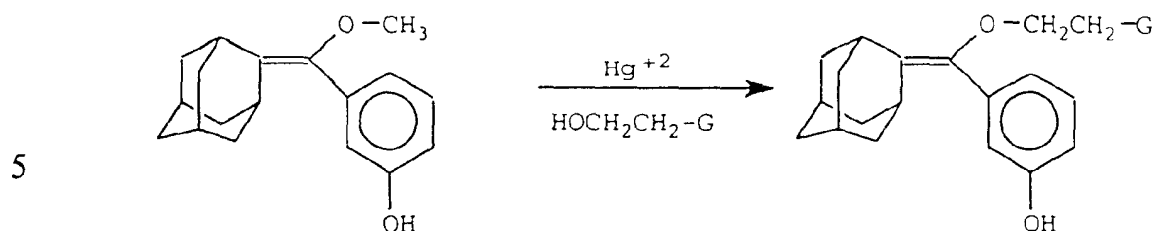
下面描述了通过新方法制备前体烯烃的反应的实例。一种低级烷基乙烯基醚化合物在(其中低级烷基 R_9 在此是指一个 $\text{C}_1 - \text{C}_4$ 直链或支链的烷基)与催化量的汞盐, 在至少 1 摩尔当量的另一种醇 $\text{R}_{10} - \text{OH}$, 例如: 一种具有式 $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{G}$ 的醇的存在下, 制造出所期望的烯烃。



具有式 $\text{CH}_2 = \text{CHOR}_a$ 的未取代乙烯基醚向另一种式 $\text{CH}_2 = \text{CHOR}_b$ 的未取代乙烯基醚的转化是已知的, 并有叙述, 例如在 W.H.Watanabe 和 L.E.Conlon, “美国化学协会期刊”, 79, 2828 (1957) 中。本方法中所用的通过汞盐催化三取代烯烃的制备方法据申请人所知, 没有任何报导。

在这一反应过程中, R_3 和 R_4 都是从无环的、单环的和多环的有机基团中选出的, 这些有机基团可以任意地被杂原子取代, 并且 R_3 和 R_4 可以任意连接在一起形成单环或多环基团 R_5 , 并螺合到二噁丁环的环上, R_2 是一个从可包括附加取代基的苯基或萘基中选出芳基环。利用汞催化反应制备烯烃

前体到本发明二噁丁环的一个实例是：

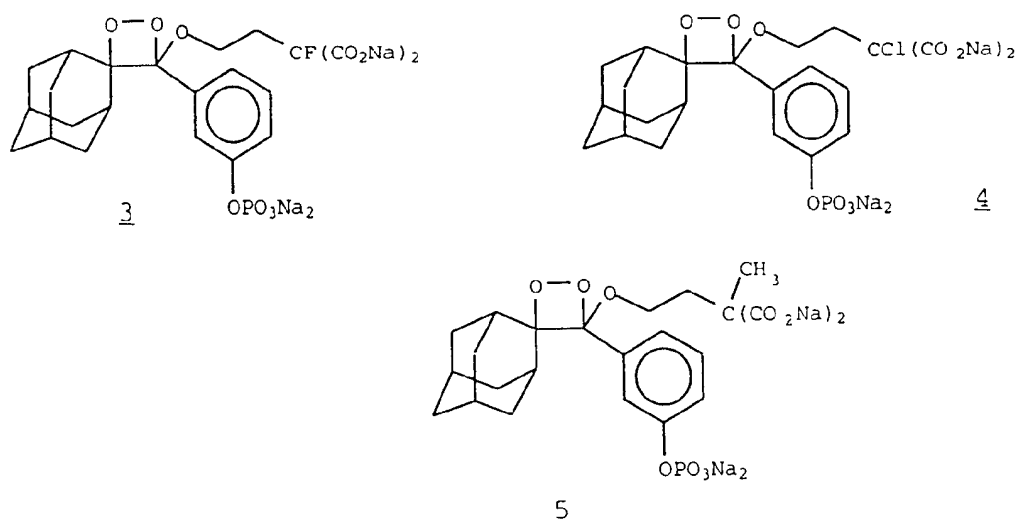


其中 G 是一个氯原子。汞盐是任意一种用来催化乙烯基醚基团的二价汞盐，并且优选是一种弱酸盐，如乙酸盐或三氟乙酸盐。汞盐的用量为催化剂量，一般为每摩尔烯烃用 0.01 - 0.5 摩尔，更普遍的为 0.05 - 0.25 摩尔。醇组分 R₁₀ - OH 可以是任意的链烷醇、取代链烷醇、苄醇、不饱和醇，如烯丙醇。醇的使用是过量的，至少为每摩尔烯烃 2 摩尔醇，优选每摩尔烯烃至少 5mol。在优选的过程中，醇被当作反应溶剂使用。反应一般(但不是必要的)应高于环境温度，最高到溶剂沸点的温度下进行。优选反应温度在大约 70 - 120 °C 范围内。用于提高反应剂的溶解性或者为改变极性或沸点目的，可使用一些附加的溶剂。

因此认识到前述的汞 - 催化的乙烯基醚交换反应，在中间体的制备过程中有特殊的用途，这些中间体是用来进一步完善本发明的三取代二噁丁环的水溶性的，但它更普遍地是用于制备广泛的各种烯烃或乙烯基醚化合物中。

具体的实施方案

20 制备出二噁丁环 1 的氟取代的类似物，标为 3，一个氯取代类似物 4 和一个甲基取代的类似物 5，并在几个星期内评估其储存稳定性。为对比，测量 1 溶液的贮存稳定性。所有溶液都是用相同的组合物制备的，区别仅在于二噁丁环化合物的不同。通过用定体积的测试溶液和固定限定量的碱性磷酸酶和测量在 25 °C 时稳定期时光强度的化学发光的酶测试法来评估稳定性。出乎意料的是，含有二噁丁环 3 和二噁丁环 5 的水溶液事实上要比 1 更稳定，但二噁丁环 4 却不行。二噁丁环 3 或 5 的水溶液在 25 °C 历经四周之后，基本上没有分解。令人惊异的是二噁丁环 4 的贮存稳定性实际上比 1 的更差。

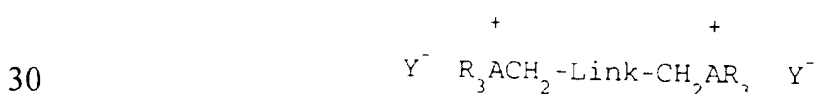


10 这四种二噁丁环化合物在性能上出现这些差异的原因，目前还不知道。特别重要的是，二噁丁环 3和4结构上的差异仅仅是具有不同的卤素取代基，就会在贮存稳定性上表现出如明显的不同。申请人在二噁丁环化学领域没有找到任何学说可以解释和预测这些结果。

此外，测试二噁丁环 3，结果显示与二噁丁环 1一样，在胶囊化学测试
 15 系统中不引起任何携带。因此，承载一个含二羧酸盐基团取代基和或者为一个氟原子或一个低级烷基的取代基的如 3和5的二噁丁环，以及含这种二噁丁环的组合物优于其它已知的用于胶囊化学分析系统中的二噁丁环和组合物。

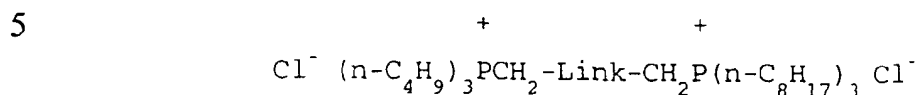
本发明的另一方面，提供了可增强化学发光的组合物。在需要最高分析
 20 灵敏度的测试中使用增强的组合物是有利的。在维持和减少从自发的二噁丁环分解中产生的外部光发射的同时，增加二噁丁环分解反应的化学发光有效性是一种提高或改善灵敏度的方式。

因此，本发明还涉及包含一种阳离子增强剂和一种稳定的 1,2 - 二噁丁
 25 环的组合物，该 1,2 - 二噁丁环如上所述，具有提高的储存稳定性，其能被触发产生化学发光。这种可以提供强化学发光的组合物包括一个上述在水溶液中的二噁丁环，和一种非聚合的阳离子增强剂物质，该物质与不存在增强剂时所产生的光相比，增加了二噁丁环和活化剂反应所产生的光量。这种增强剂物质优选是一种具有下式的双阳离子表面活性剂：



其中每一个 A 可独立地从 P 和 N 原子之中选出，其中 Link 是一包含至少两

个碳原子的有机连接基团，这些基团是从取代的和未取代的芳基、烷基、链烯基和炔基中选出的，并且其中的 Link 可以包含杂原子，其中的 R 可选自含 1 至 20 个碳原子的低级烷基或芳烷基，其中 Y 是一个阴离子。特别优选增强剂物质是具有下式的双阳离子表面活性剂，



其中 Link 是一个亚苯基。

为提供强化学发光，本发明的组合物可以任意地包含至少一个荧光增白剂作为补充的增强剂。有用的荧光增白剂是那些能够通过能量转移增加所发
10 光量的化合物。阴离子荧光增白剂被认为是特别有效的，这是由于其与阳离子增强物质有利的静电相互作用。特别优选的荧光增白剂是阴离子化合物和，但不限于，羟基芪磺酸和荧光素。

为了更全面地描述本发明的各个方面，以下提供了描述特定实施方案的非限制性实施例，用以举例说明本发明。

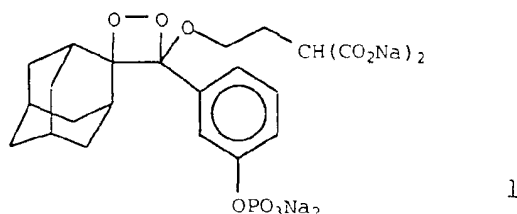
15

实施例

实施例 1：二噁丁环 1 的制备

根据申请人的美国专利 5,631,167 中描述的反应顺序制备二噁丁环[4 - (3,3 - 双羧基)丙氧基] - 4 - (3 - 磷酸氧苯基)]螺[1,2 - 二噁丁环 - 3,2' - 三
20 环 - [3.3.1.1^{3,7}]癸烷]的四钠盐。直到中间体烯烃[(3 - 羧基丙氧基) - (2 - 碘代乙氧基) - 亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成基本上如美国专利申请 5,013,827 和 5,068,339 中所叙述的进行。

25



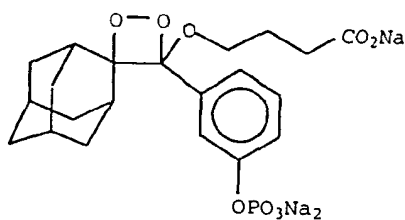
1

实施例 2 二噁丁环 2 的制备

二噁丁环[4 - (3 - 羧基丙氧基) - 4 - (3 - 磷酸氧苯基)]螺[1,2 - 二噁丁
30 环 - 3,2' - 三环 - [3.3.1.1^{3,7}]癸烷](2)是根据申请人的美国专利 5,631,167 中描述的反应顺序来制备。直到中间体烯烃[(3 - 羧基丙氧基) - (3 - 羧基) - 亚甲基] - 三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成方法基本上如美国专利 5,013,827 和

5,068,339 中所叙述方法进行。

5

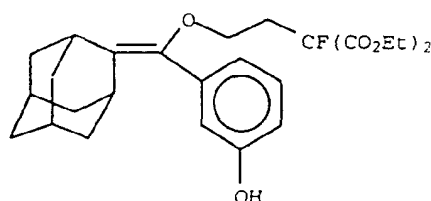


2

实施例 3 二噁丁环 3 的制备

这种二噁丁环是根据下述反应顺序制备。直到中间体烯烃[(3-羟苯基)-(2-碘代乙氧基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成如实施例 1 中描述的方法进行。

10

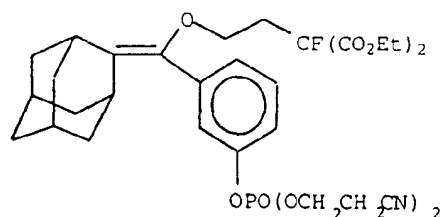


15

(a)[((3-双羧乙氧基)-3-氟代丙氧基)-(3-羟苯基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成。

氢化钠(75mg 60%分散在油中)用正己烷清洗干净至没有油，真空下干燥并加到 4mL 的无水二甲基亚砜中。加入 0.3g 氟代丙二酸二乙酯，在氩气(Ar)保护下，搅拌悬浮液 15 分钟。再把溶解在 5mL 无水二甲基亚砜中的碘代乙氧基烯烃 0.5g 的溶液加入到反应混合物中。将反应加热至 100℃并搅拌 2 小时。冷却后，用 30mL 的乙酸乙酯稀释该混合物。然后用水提取乙酸乙酯溶液 3-4 次，干燥并蒸发。用在正己烷中的 5-20% 乙酸乙酯作色层分离，得到期望的化合物 0.25g，得率 45%。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.28(t, 6H), 1.66-1.95(m, 12H), 2.45(t, 1H), 2.52(t, 1H), 2.67(br s, 1H), 3.20(br s, 1H), 3.52(t, 2H), 4.23-4.30(q, 4H), 6.74-7.22(m, 4H)。

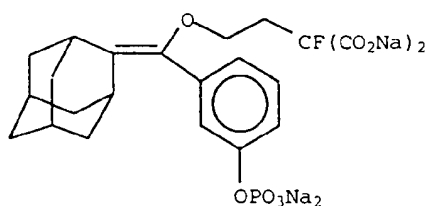
25



30

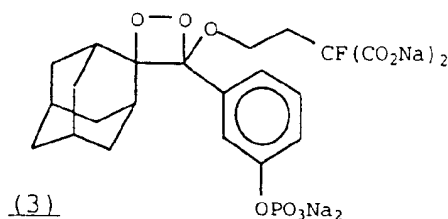
(b)[[(3,3 - 双羧乙氧基) - 3 - 氟代丙氧基) - (3 - (双 - (2 - 氟乙基)磷酸基氧)苯基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成

- 5 将一个有 10mL CH₂Cl₂ 的烧瓶, 在一层氩气下用冰浴冷却。加入 1.71mL 吡啶后, 缓慢加入 0.61mL POCl₃, 且持续搅拌 15 分钟。将从步骤(a)中得到的烯烃 0.972g 溶于 10mL CH₂Cl₂ 中, 然后将由此得到的溶液逐滴加入其中。撤去冰浴并搅拌该溶液 2.5 小时。向该溶液中加入 1.71mL 吡啶和 1.44mL 2 - 氟基乙醇。搅拌该反应混合物 12 - 15 小时, 生成白色沉淀物。将该混合物用 CH₂Cl₂ 稀释并用 4 × 50mL 的水清洗。干燥和蒸发 CH₂Cl₂ 提取液, 通过使用在正己烷中的 75 % 乙酸乙酯的色谱法纯化粗产物。得到总计 1.2g 的油(88 %). ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.29(s, 6H), 1.79 - 1.97(m, 12H), 2.46 - 2.53(2t, 2H), 2.63(br s, 1H), 2.83(t, 4H), 3.20(br s, 1H), 3.50(t, 2H), 4.24 - 4.31(q, 4H), 4.35 - 4.51(m, 4H), 7.13 - 7.36(m, 4H); ³¹P NMR(CDCl₃) δ 9.49(P).



20

- (c)[(3,3 - 二羧基 - 3 - 氟代丙氧基) - (3 - 磷酸基氧苯基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}] - 癸烷四钠盐的合成方法。将从步骤(b)得到的烯烃 1.2g 溶解在 20mL 丙酮中。加入 297mg NaOH 在 4mL 水中的溶液。搅拌过夜, 其间有沉淀生成。轻轻倒出上面液体, 并且用 10 × 5mL 的丙酮洗涤固体。在真空中干燥, 得到 1.0g 白色固体。 ¹H NMR(D₂O) δ 1.75 - 1.89(m, 12H), 2.29(t, 2H), 2.37(t, 2H), 2.57(br s, 1H), 3.12(br s, 1H), 3.56(t, 2H), 6.99 - 7.30(m, 4H); ³¹P NMR(D₂O) δ 0.69(S).



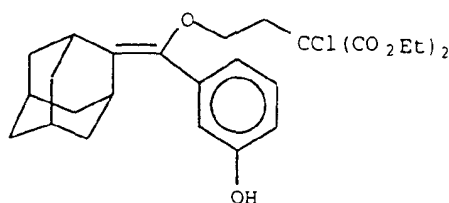
30

(d)[4 - (3,3 - 二羧基) - 3 - 氯代丙氧基) - 4 - (3 - 磷酸基氧苯基)]螺[1,2 - 二噁丁环 - 3,2' - 三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]的四钠盐(3)的合成。将由步骤(c)得到的烯烃 348.6mg 溶解在 10mL 的 D₂O 中。将聚合物粘合(polymerbound)的玫瑰红悬浮在 10mL p - 二噁烷中, 加入到水溶液中。将反应混合物冷却到 5 - 8 °C, 开始氧气鼓泡, 混合物通过 5 密耳的 KAPTON 过滤器用钠灯照射。共 2.5 小时之后, 过滤掉聚合物球, 蒸干溶液得到白色固体(3)。¹H NMR(D₂O) δ 0.93 - 1.79(m, 12H), 2.19(br s, 1H), 2.41 - 2.49(m, 2H), 2.97(br s, 1H), 3.40 - 3.49(m, 2H), 7.19 - 7.42(m, 4H); ³¹P NMR(D₂O) δ 0.575(S).

10 实施例 4. 二噁丁环 4 的制备

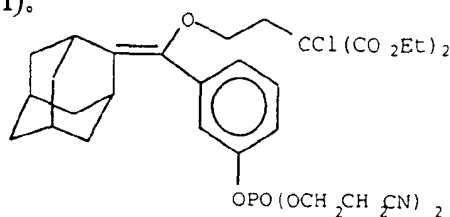
这种二噁丁环是根据下面的反应顺序制备的。直到中间体烯烃[(3 - 羟基苯基) - (3,3 - 二羧乙氧基)丙氧基亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成如实施例 1 所述。

15



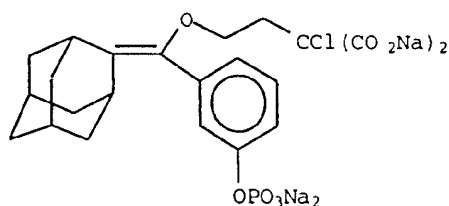
(a)[[(3,3 - 二羧乙氧基) - 3 - 氯代丙氧基] - (3 - 羟基苯基)亚甲基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]的合成。在 - 78 °C 氩气环境下, 把 1.2g(3,3 - 二羧基乙氧基丙氧基) - (3 - 羟基苯)亚甲基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷溶于 10mL 干燥 THF 中形成的溶液加入于 25 - 30mL 干燥 THF 2.4 当量的 LDA 中。反应在 - 78 °C 下搅拌 30 分钟, 并用在 15mL 干燥 THF 中 0.58gN - 氯代琥珀酰亚胺的溶液处理。允许反应混合物在一小时内加热至室温, 并且再搅拌 1 小时。然后在真空下除去 THF, 并把残余物溶解在 100mL 乙酸乙酯中。用水洗涤有机溶液, 然后干燥、蒸发, 并用柱色谱分离粗物质。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.23(t, 6H), 1.7 - 2.00(m, 12H), 2.57(t, 2H), 2.65(br s, 1H), 3.2(br s, 1H), 3.56(t, 2H), 4.22(q, 4H), 6.65 - 7.25(m, 4H).

30



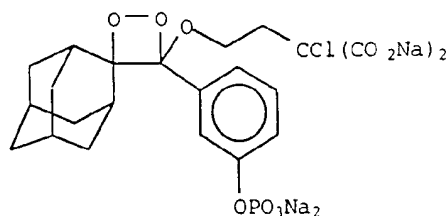
- (b)[[(3,3 - 二羧乙氧基) - 3 - 氯代丙氧基 - (3 - (二 - (2 - 氟基乙基)磷酸基氧)苯基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成。在一层氩气下将有 25mL
- 5 CH₂Cl₂ 的烧瓶用冰浴冷却。加入 1.5g 吡啶后, 缓慢加入 1.82g POCl₃, 持续搅拌 15 分钟。逐滴加入在 25mL CH₂Cl₂ 中的从步骤(a)得到的烯烃 1.5g 和 1.5g 吡啶的溶液。然后去掉冰浴, 搅拌溶液 1 小时。再用冰浴冷却该溶液, 并顺序地用 3.0g 吡啶和 2.8g 2 - 氟基乙醇处理。反应混合物搅拌 12 - 15 小时后, 得到白色沉淀。混合物用 CH₂Cl₂ 稀释并用水洗涤。干燥和蒸发 CH₂Cl₂ 提取
- 10 液, 使用在正己烷中的 50 % 乙酸乙酯通过色谱法纯化粗产品, 得到总计 1.4g 的油。 ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.278(t, 6H), 1.80 - 1.97(m, 12H), 2.565(t, 2H), 2.63(br s, 1H), 2.826(t, 4H), 3.20(br s, 1H), 3.556(t, 2H), 4.271(q, 4H), 4.40 - 4.47(m, 4H), 7.15 - 7.36(m, 4H)。

15



- (c)[(3,3 - 二羧基 - 3 - 氯代丙氧基 - (3 - 磷酸基氧苯基)亚甲基)]三环
- 20 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷的四钠盐的合成。将从步骤(b)中得到的烯烃溶解在 25mL 丙酮中。加入 3mL 水中溶解有 0.22g NaOH 的溶液。将该溶液搅拌过夜, 其间有沉淀形成。慢慢倾倒出液体, 固体用丙酮研制。过滤白色固体, 进一步用丙酮洗涤并在真空中干燥。 ¹H NMR(D₂O) δ 1.77 - 1.92(m, 12H), 2.422(t, 2H), 2.59(br s, 1H), 3.15(br s, 1H), 3.635(t, 2H), 7.02 - 7.33(m, 4H)。

25



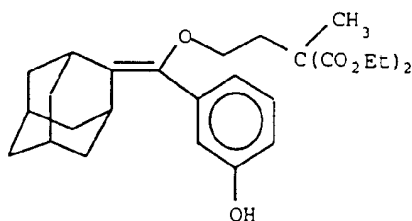
30

- (d)[4 - (3,3 - 二羧基) - 3 - 氯代丙氧基] - 4 - (3 - 磷酸基氧苯基)]螺[1,2

- 二噁丁环 - 3,2' - 三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]的四钠盐(4)的合成。从步骤(c)得到的烯烃 35mg 溶解在 1.0mL D₂O 中。在 1.0mL 的 p - 二噁烷 - d₈ 中浸清聚合物粘合的玫瑰红 500mg 5 分钟, 然后加到水溶液中。将反应混合物冷却到 0 °C, 开始通入氧气泡并在经过 5 密耳 KAPTON 过滤器时用钠灯照射 45 分钟, 生成经 NMR 鉴定的产物 4。过滤混合物并在缓冲溶液中稀释用于酶测试。¹H NMR(D₂O) δ 1.05 - 1.96(m, 12H), 2.19(br s, 1H), 2.60 - 2.62(m, 2H), 3.07(br s, 1H), 3.56 - 3.58(m, 2H), 7.25 - 7.44(m, 4H)。

实施例 5 二噁丁环 5 的制备

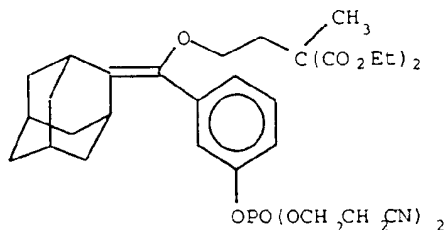
这种二噁丁环通过下述的反应顺序制备。直到中间体烯烃[(3 - 羟基苯基) - (2 - 碘代乙氧基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成如实施例 1 所述。



15

(a)[((3,3 - 二羧乙氧基丁氧基) - (3 - 羟基苯基)亚甲基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷)的合成。氢化钠(60 % 分散在油中, 0.866g)用正己烷清洗至无油, 真空下干燥, 加入到 15mL 无水 DMSO 中。加入 2.4g 甲基丙二酸二乙酯, 并在氩气下搅拌悬浮液 15 分钟。把溶于 15mL 无水 DMSO 中的 2.8g 碘代乙氧基烯烃溶液加入至反应混合物中。将反应混合物加热至 100 °C 并搅拌 2 小时。冷却后, 用 30mL 乙酸乙酯稀释混合物。乙酸乙酯溶液用水提取 3 - 4 次, 然后干燥并蒸发。粗产品用在正己烷中的 5 - 20 % 的乙酸乙酯经色层分离, 得到期望的化合物 0.80g, 收率 25 %。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.208(t, 6H), 1.347(s, 3H), 1.76 - 1.96(m, 12H), 2.20(t, 2H), 2.66(br s, 1H), 3.20(br s, 1H), 3.41(t, 2H), 4.09 - 4.17(q, 4H), 6.78 - 7.26(m, 4H)。

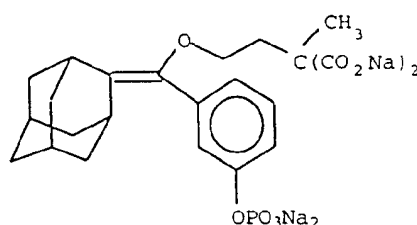
25



30

(b)[((3,3 - 二羧乙氧基丁氧基 - 3 - (二 - (2 - 氟乙基)磷酰基氧)苯基)亚甲基]

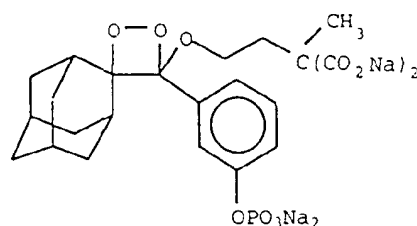
三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷的合成。在一层氩气下，用冰浴冷却装有 15mL CH₂Cl₂ 的烧瓶。加入 1.38g 吡啶，接下来缓慢添加 0.8g POCl₃ 后，继续搅拌 15 分钟。在 15mL CH₂Cl₂ 中溶解从步骤(a)得到的烯烃 0.8g，将得到的溶液逐滴加入烧瓶中。撤去冰浴并搅拌溶液 1 小时。向该溶液中加入 1.38g 的吡啶和 1.24g 的 2-氟基乙醇。搅拌反应混合物 12 - 15 小时，结果生成白色沉淀。混合物用 CH₂Cl₂ 稀释，并且用 4 × 50mL 水洗涤。干燥和蒸发 CH₂Cl₂ 提取剂。粗产品使用在正己烷中的 75 % 乙酸乙酯用色谱法纯化。得到总计 0.55g 的油 (55 %)。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.208(t, 6H), 1.34(s, 3H), 1.78 - 1.97(m, 12H), 2.18(t, 2H), 2.61(br s, 1H), 2.81(t, 4H), 3.21(br s, 1H), 3.41(t, 2H), 4.09 - 4.16(q, 4H), 4.37 - 4.46(m, 4H), 7.14 - 7.34(m, 4H)。



15

(c)[(3,3 - 二羧基丁氧基) - (3 - 磷酸基氧苯基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷四钠盐的合成。把由步骤(b)得到的烯烃 0.47g 溶解在 14mL 的丙酮中。把 1.5mL 水中溶有 0.117g NaOH 的溶液加入其中。将该溶液搅拌过夜，其间有沉淀生成。慢慢倾出液体，固体用 10 × 5mL 的丙酮洗涤。在真空下干燥后，得到白色固体 0.383g(92 %)。¹H NMR(D₂O) δ 1.09(s, 3H), 1.75 - 1.90(m, 12H), 2.00(t, 2H), 2.57(br s, 1H), 3.13(br s, 1H), 3.47(t, 2H), 7.01 - 7.29(m, 4H)。

25



(5)

(d)[4 - (3,3 - 二羧基丁氧基) - 4 - (3 - 磷酸基氧苯基)]螺[1,2 - 二噁丁环 - 3,2' - 三环[3.3.1.1^{3,7}] - 癸烷]的四钠盐(5)的合成。将从步骤(c)得到的烯烃 65mg 溶解在 3mL 的 D₂O 中。将悬浮在 3mL p - 二噁烷中的聚合物粘合的玫瑰红 35mg 加入到水溶液中。将反应混合物冷却至 5 - 8 °C，开始通入氧气泡，并经过 5 密耳的 KAPTON 过滤器用钠灯照射 1 小时，得到产物(5)。过

滤掉聚合物小球，溶液用于制备测试用的原料溶液。 $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O}) \delta$ 0.92 - 1.33(m, 5H), 1.38 - 2.21(m, 13H), 2.92(br, s, 1H), 3.19 - 3.32(m, 2H), 7.14 - 7.73(m, 4H)。

5 实施例6 可供选择的二噁丁环 3 制备方法

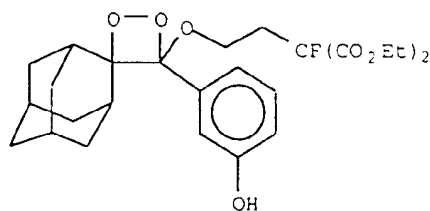
使用[(3 - 羟基苯基)甲氧基亚甲基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷作为起始原料根据下述反应顺序制备二噁丁环。在美国专利 4,983,779 中描述过这种化合物的制备。

(a)将烯烃[(3 - 羟基苯基)甲氧基亚甲基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷 12g 加入到 100mL 的 2 - 氯乙醇中并搅拌。然后在氩气环境下向混合物中加入催化剂量的 $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ 2.8g。反应在 110 °C 搅拌 5 小时。在冷却至室温后，在真空下除去氯代乙醇。将固体溶解在 EtOAc 中并用水洗涤。EtOAc 层通过 Na_2SO_4 进行干燥并蒸发，生成[(3 - 羟基苯基) - (2 - 氯代乙氧基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷。

(b)基本上如美国专利 5,013,827 和 5,068,339 所述，在上述化合物中用碘原子替换氯原子。

(c)在上述实施例 3 中描述了从[(3 - 羟基苯基) - (2 - 碘代乙氧基)亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷合成[(3 - 羟基苯基) - (3,3 - 二羧乙氧基) - 3 - 氟代丙氧基亚甲基]三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷。

20

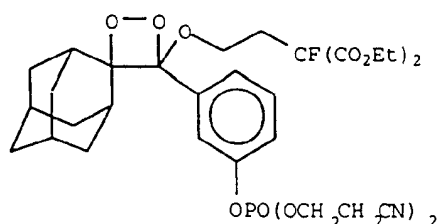


(d)从步骤(c)得到的氟代丙二酸酯烯烃 0.375g 用大约 1mg 在 15mL CH_2Cl_2 中的亚甲蓝进行光氧化。在通入氧气并冷却溶液至 - 78 °C 后，通过 5 密耳 KAPTON 过滤器用钠灯照射 45 分钟，然后允许加热至室温。蒸发掉 CH_2Cl_2 ，残余物用在 CH_2Cl_2 中的 0 - 5 % 的 EtAc 作洗脱剂色层分离，生成[4 - (3,3 - 二羧乙氧基 - 3 - 氟代丙氧基) - 4 - (3 - 羟基苯基)]螺(1,2 - 二噁丁环 - 3,2' - 三环[3.3.1.1^{3,7}] - 癸烷]。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ 0.97 - 1.02(m, 1H), 1.21 - 1.33(m, 7H), 1.45 - 1.91(m, 10H), 2.23(br s, 1H), 2.48 - 2.80(m, 2H), 2.96(br s, 1H), 3.35 - 3.44(m, 1H), 3.65 - 3.75(m, 1H), 4.21 - 4.40(m, 4H), 6.85 -

30

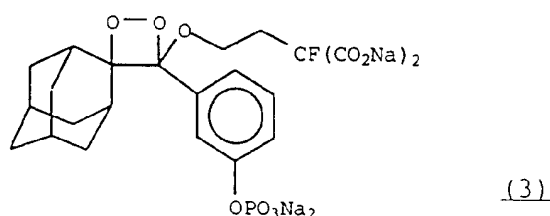
7.40(m, 4H).

5



(e)将由前面步骤得到的二噁丁环用以下方法进行磷酸化。 2mL 的无水吡啶和 10mL 的 CH_2Cl_2 的溶液在氩气下冷却至 0°C ，并滴加入在 10mL CH_2Cl_2 中的 0.424g POCl_3 的溶液。经过 15 分钟后，再滴加入在 10mL CH_2Cl_2 中的 0.424g 的二噁丁环溶液。允许溶液加热至室温，并搅拌 4 小时。再一次将溶液冷却至 0°C ，滴加入在 10mL CH_2Cl_2 中的 0.75g 氰基乙醇的溶液。搅拌 2.5 小时后将该溶液加热至室温，在蒸干后，残余物使用在正己烷中的 50 - 100 % 乙酸乙酯作为洗脱剂色谱法分离。在真空下除去溶剂得到无色油，然后把二噁丁环溶解在 100mL CH_2Cl_2 中，并且 I 型水洗涤三次。有机层用 Na_2SO_4 干燥后，过滤并蒸发，生成磷酸化的二噁丁环。 ^1H NMR(CDCl_3) δ 0.90 - 0.95(m, 1H), 1.24 - 1.33(m, 7H), 1.46 - 2.20(m, 11H), 2.50 - 2.86(m, 6H), 2.96(br s, 1H), 3.32 - 3.41(m, 1H), 3.62 - 3.73(m, 1H), 4.20 - 4.48(m, 8H), 7.30 - 7.70(m, 4H); ^{31}P (CDCl_3) - 9.53(P).

20



(f)烷基的除去是通过将前面步骤中得到的二噁丁环与溶于 1mL I 型水中的 47.2mg NaOH 和 10mL 丙酮在氩气下反应过夜。从形成的油性残余物中倾出溶剂。然后用 2mL 的丙酮清洗 2 次油，并用另外 10mL 丙酮研制以生成粉末状白色固体。通过吸滤收集固体二噁丁环 3，并另外用 20mL 丙酮清洗。

在可供选择的过程中，步骤(d)的二噁丁环产物可直接由下面过程转化成二噁丁环 3。 2mL 的无水吡啶和 10mL 的 CH_2Cl_2 的溶液在氩气环境下冷却至 0°C ，并滴加溶解在 10mL CH_2Cl_2 中的 0.424g POCl_3 的溶液。 15 分钟之后，滴加溶解在 10mL CH_2Cl_2 中的 0.424g 二噁丁环的溶液。允许该溶液加

热至室温并搅拌 4 小时。形成磷酸酯盐，并通过将得到的二氯磷酯盐二噁丁环与溶解在 1ml I 型水中的 47.2mg NaOH 和 10ml 丙酮在氩气下反应过夜而水解掉酯基。从包含产物的残余物中除去溶剂。然后用丙酮洗涤产物，如果需要，还可用丙酮研制以产生白色粉末固体。通过抽滤收集二噁丁环 3。

5 实施例 7. 在胶囊化学分析系统中试剂携带问题的发现

下面的实验是在基本上如 Kumar 等人的美国专利 5,399,497 中描述的原型胶囊化学分析系统中进行的，同时构造了检测系统用来测量光的发射(发光)。该方法和设备包括输送液流段穿过特氟隆管，其中在管的内表面有碳氟油的隔离层。样品和试剂被吸入该管中，得到的液体段通过该管移动。非均匀免疫测定法需要的分离步骤和清洗步骤通过磁体得到了促进，其将磁性颗粒从一个水性段转移另一水性段。检测系统包括一个光子计数器和一个纤维光学读数头，其中的纤维在特氟隆管周围径向排列以最大化光收集效果。

将 TECHNICON IMMUNO 1[®]TSH 方法用作检测发光试剂的具有代表性的免疫测定法。该方法的原理为将含抗原 TSH 和含荧光素标记抗体的第一试剂(R₁)，同时还有含抗体 - 碱性磷酸酶(ALP)共轭物的第二试剂(R₂)保温培养。每种抗体专门对应 TSH 抗原上不同的抗原决定部位，所以在这二种抗体和 TSH 抗原之间促进了“三明治”的形成。用含结合反荧光素(bound anti - fluorescein)的磁性颗粒俘获该三明治，接下来清洗该颗粒以除去未结合的试剂。然后将该颗粒暴露在发光试剂中，该发光试剂中含有一种用于 ALP 的基质，并且测量发光。

发光的 R₃ 试剂含有：0.2mM CSPD 即 3 - (4 - 甲氧基螺 { 1, 2 - 二噁丁环 - 3, 2' - (5' - 氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷 } - 4 - 基)苯基磷酸二钠(Tropix, Inc., Bedford, MA, USA), 3mM pyranine(羟基芘磺酸), 1mM MgCl₂, 1M 二乙醇胺缓冲剂(pH 10.0), 0.1 % Triton(三硝基甲苯)X - 100 和 0.1 % 的 NaN₃。在胶囊化学分析系统上作用的顺序描绘在图 1 中。流体胶囊或测试包装含有六个液体段，每一个都有 28 μL 的容积。将磁性颗粒(使用于 TECHNICON IMMUNO1 系统中的 1.4 μL 的磁性颗粒试剂)吸入第一段(MP), 用剩余的液体作颗粒清洗缓冲剂(25mM Tris, pH7.5, 包含 0.2M NaCl, 0.1 % Triton X - 100 和防腐剂)。将 R₁(含抗 TSH 的荧光素标记的抗体的血清基溶液 10.4 μL), R₂(含抗与 ALP 共轭的 TSH 的抗体的血清基溶液 10.4 μL)和 S(7.2 μL 的血清样品)吸入第二段。接下来的两段(W1 和 W2)包括与

上述 MP 段中使用的相同的清洗缓冲剂。第 5 段是 R_3 为如上所述的组合物，关键成分是发光的基质和发光增强剂。第六段是中间测试(inter-test)缓冲剂(与前面描述的颗粒缓冲剂相同)，用于分隔相邻的测试。磁性转移用箭头绘在图 1 中。这些磁性转移通过两个磁性转移组合体(M1 或 M2)的一个得到了促进。在保温 13 分钟之后，保温期间形成了“三明治”，M1 将磁性颗粒转移入 $R_1 + R_2 + S$ 段以开始俘获。在又经过 6 分钟后，M2 将该颗粒转移进入第一个清洗段。经过 12 秒后，M2 将该颗粒转移进入第二个清洗段。再经 12 秒后，M2 将该颗粒转移进入 R_3 段。从这部分发出的光如水性段流一样反复经过光测量器的读数头从而被测量到。

10 由于特氟隆管是透光的，于是预料到具有光通道的问题(或称“光携带”)。具体地说，一些从相邻测试的 R_3 段发射出的光量子能进入特氟隆材料，沿着试管的长度传播，并在测量有意义的测试信号期间散射进入检测器。但是，当在相邻的测试中检测到一个信号时，它并没有按期望的方式发生。代替随着与测试 N 的距离而迅速衰减的是，观测到输出光的峰是以相邻测试包装的 R_3 段为中心环绕，如图 2 所示。在图 2 中，测试 N 发光程度较高，近似地有 7.5×10^6 CPS(每秒钟的计数)。将试验品 N - 1 和 N - 2 在试验品 N 之前吸入管，并先于 N 通过测光器，试验品 N + 1 和 N + 2 跟随在 N 之后。分析系统记录了气流中每一个单独的气体 and 液体段的光量子。图 2 的分布代表五个试验品 10 个重复组的平均值，每一个均对不存在 ALP 时所产生的背景发光信号作了修正。从每个数值点减去的试剂空白值是从 5 个试验品的 10 个重复组中得到的平均值。携带信号数值是通过把每一个相邻测试的峰值 CPS 除以试验 N 中的峰值 CPS 来计算的，表示为每百万之一(ppm)。

25 这种情况的另一个可能的解释是 ALP 从测试 N 中通过一种无意识的方式进入相邻测试的物理携带。这是可能发生的，例如，如果该管包含有沉积在其壁上的颗粒物质，它能破坏液体段通过管的平稳运动。但是，在相邻测试的 R_3 段中放置 10mM 的无机磷酸盐，没有影响相邻测试中的信号值。由于在这些测试条件下，这种数量的磷酸盐本来会抑制至少 90 % 的 ALP，所以物理携带的可能性被排除了。

30 为进一步排除光学携带，只在试验 N 中省略荧光增强剂羟基吡磺酸，但其存在于邻近测试中。结果，测试 N 中信号的量降低了大约 10 倍。但是，

如附图中图 3 所示，相邻试剂中峰的高度没有明显的变化。携带信号不在相邻试剂中明显的成比例的变化这一事实清楚地证明了这种携带不是光学的。

另外的和意想不到的携带类型是引起携带问题的原因。已发现羟基二噁丁环中间体在用于涂覆特氟隆内表面的碳氟油中是充分可溶的，结果是携带归结于由于溶解的羟基二噁丁环中间体通过油转移进入相邻测试的 R₃ 段。这一过程是通过改变在相邻试剂中 R₃ 段的缓冲剂，从 pH10 的 1M DEA 到 pH7 的 1M Tris 来检测的。当 pH7 时，在 R₃ 段中溶解的羟基二噁丁环中间体是稳定的并且不发射光。如附图中图 4 所示，这种在 pH 方面的改变的结果是彻底消除了边带发光。在 N + 1 和 N - 1 测试中剩余的较少的携带是由预计的光学携带引起。这些结果证明了在相邻的测试中峰的光发射源是羟基二噁丁环的“化学携带”，而羟基二噁丁环是来源于 CSPD，进入邻近测试的 R₃ 段。

实施例 8 观察到的有二羧基取代二噁丁环 1 的化学携带的消除

表 1 表示了反应中间体的化学携带问题上，使用其它三种二噁丁环的效果。LUMIGEN PPD[4 - (甲氧基) - 4 - (3 - 磷酰基氧苯基)]螺[1,2 - 二噁丁环 - 3,2' - 三环[3.3.1.1^{3,7}] - 癸烷](Lumigen Inc., Southfield, MI, USA), 二噁丁环 2(一个单羧酸衍生物)和二噁丁环 1(一个二羧酸衍生物)，均以相同浓度用在测试配方中。ppm 栏是 N + 1 测试的信号，其代表了最坏的情况。发现未改性的母体化合物(PPD)的携带是所观察到的 CSPD 的 2 倍多。令人惊奇地是单羧酸衍生物，二噁丁环 3，显示化学携带的数量只有 84 % 的减少。这表明，单个带电基团不足以完全阻止反应中间体在碳氟油中的溶解。但是，二羧酸衍生物却是 100 % 有效的，表明两个带电基团可充分达到所期望的结果。

表 1. 化学携带的减少

化合物	ppm	减少 %
LUMIGEN PPD	1640	
二噁丁环 2	260	84
二噁丁环 1	0	100

实施例 9 增强剂的作用

作为基于二噁丁环 1 试剂的最优化的一部分，检验了许多增强剂材料。在 pH 值为 9.6 时，增强剂 A(1 - 三辛磷甲基 - 4 - 三丁基磷甲基苯二氯化

物)提高发了光信号 6.2 倍, 增强剂 B(聚(乙烯基苄基三丁基磷二氯化物))提高了信号 19.7 倍。pH 为 10.0 时, 增强剂 A 提高了信号 4.8 倍, 而增强剂 B 提高了信号 18.9 倍。

5 尽管事实是增强剂 B 可获得更高的光强度, 但还是优选增强剂 A 用于分析系统, 因为它是一种小分子量的单体化合物。聚合物, 特别地如果它们是聚阳离子的, 会与血清组分相互作用, 引起沉降, 这会给分析系统的操作带来明显的问题。

已发现荧光素和羟基芘磺酸都可以有效地用作与增强剂 A 结合的补充的荧光增白剂。这些荧光增白剂单独使用时, 必须在相对较高的浓度 3mM, 10 以为了达到 10 倍的提高。但是, 结合增强剂 A 后, 观测到协同效果, 此时得到可比较的提高, 而荧光增白剂的浓度与无增强剂时相比, 降低了 100 倍。表 2 和表 3 显示了由羟基芘磺酸和荧光素引起的增加量, 增强剂的存在量分别为 1mg/mL。

表 2. 通过具有增强剂 A 的羟基芘磺酸的提高

15	<u>[羟基芘磺酸](mM)</u>	<u>提高倍数</u>
	0.01	3.7
	0.02	7.3
	0.03	9.8
	0.04	12.2
20	0.05	13.7

表 3. 通过具有增强剂 A 的荧光素的提高

	<u>[荧光素](mM)</u>	<u>提高倍数</u>
	0.01	2.6
	0.02	4.0
25	0.05	7.1
	0.10	8.7

实施例 10 胶囊化学分析系统的优化配方

上面的观察结果导致胶囊化学分析系统优化配方的研制。这种配方包括: 0.1 - 1mM 二噁丁环 1, 0 - 0.05mM 的羟基芘磺酸, 0.1 - 5mg/mL 30 的增强剂 A, 0 - 1mM Mg^{+2} , 0.1 - 1M 的 2 - 氨基 - 2 - 甲基 - 1 - 丙醇(pH10.0)和 0.01 - 1 % Triton X - 100。使用这一配方的结果为化学携带

问题的完全消除和增强的性能。

实施例 11 用酶检验法测定二噁丁环 1, 3, 4 和 5 的稳定性

分别地制备含 0.1mg/mL 增强剂 A， 0.88mM Mg^{+2} ， 0.2M 2 - 氨基 - 2 - 甲基 - 1 - 丙醇(pH10)， 0.1 % Triton X - 100 和 0.5M 的二噁丁环 1, 3, 4 和 5，并在 4 °C、 25 °C 和 40 °C 下分别保存在不透明的聚乙烯瓶中。从每一个瓶中吸取 24 个 100 μ L 的等分试样，放入具有 96 套管板(well plate)的套管(well)中，将该溶液在 37 °C 保温，向每一个套管中注入 10 μ L 包含 8×10^{-17} 摩尔 AP 的溶液，对经过 5 小时的光强度求积分。数据是所有 24 个套管的平均值。对每一种二噁丁环，在指定的时间间隔重复该实验。在图 5 的结果显示在 25 °C 时三种配方比较的稳定性。如图 5 所示，发现事实上氟取代的二噁丁环 3 比氯取代的二噁丁环 4 和非卤素取代的二噁丁环 1 表现出更好的贮存稳定性，在 40 °C 时二噁丁环 3 和 5 也基本上比 1 和 4 更稳定。

表 4. 配方的贮存稳定性

时间(星期)		剩余的二噁丁环 %			
		1	3	4	5
15	0	100	100	100	100
	1	94.8			100
	2	91.1		77.0	99.8
	3	87.5	99.1	66.0	
	4	84.1		65.6	99.4
20	5	81.8			
	6	80.7			
	9	76.5	96.9		
	10			57.5	
	12		96.7		
25	14		93.8		
	21		93.6		

实施例 12 二噁丁环 3 的性能

在如实施例 7 所述的测试系统中，评估了掺入二噁丁环 3 的检测试剂。该测试材料是荧光素标记的碱性磷酸酶，其被俘获到磁性颗粒上。使用含 3 试剂的 AP 的测定法与使用二噁丁环 1 的结果相比，得到的结果具有灵敏性。

动力范围和精确性。

前面的实施例仅仅是举例说明，不能用来限制本发明。本发明的范围只在所附的权利要求书和同等材料中指出。

5

注：

Ac: 乙酰基

DMF：二甲基甲酰胺

DMSO: 二甲基亚砷

Et：乙基

10

EtOAc: 乙酸乙酯

THF：四氢呋喃

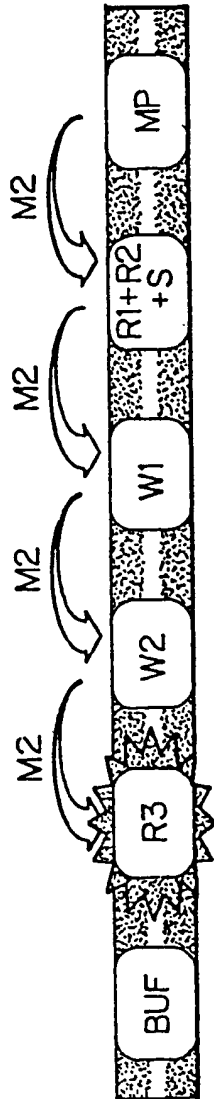


图 1

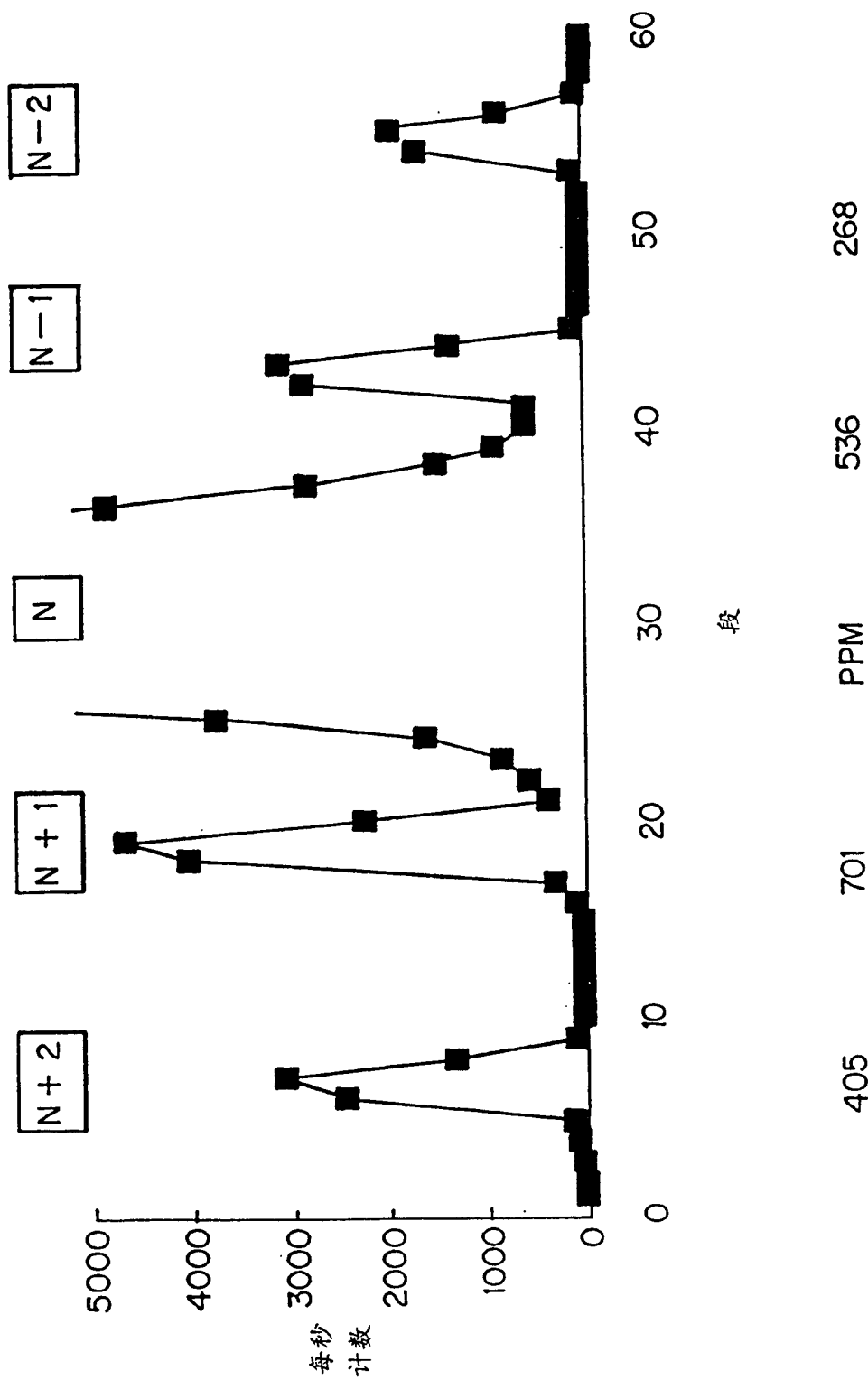


图 2

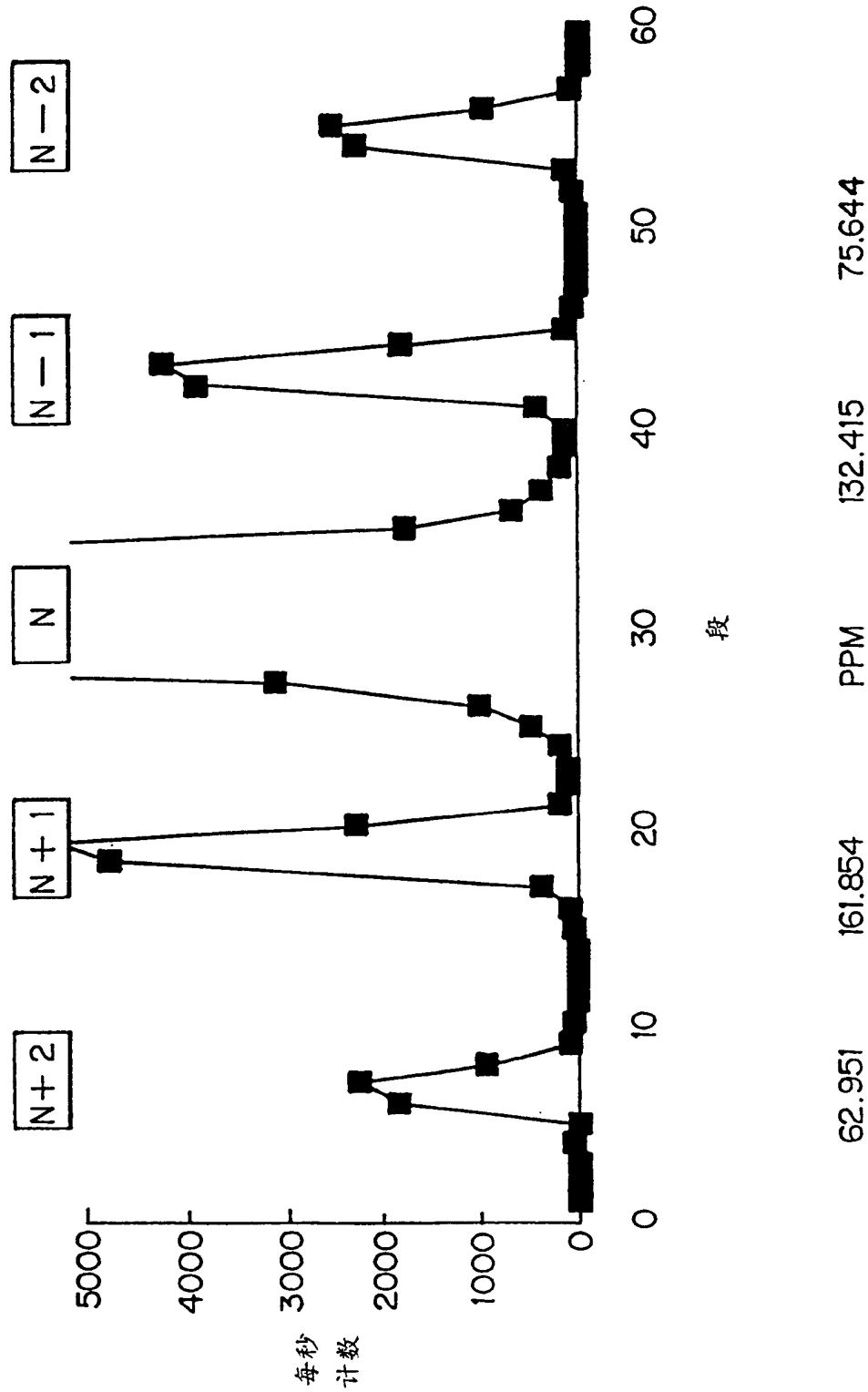


图 3

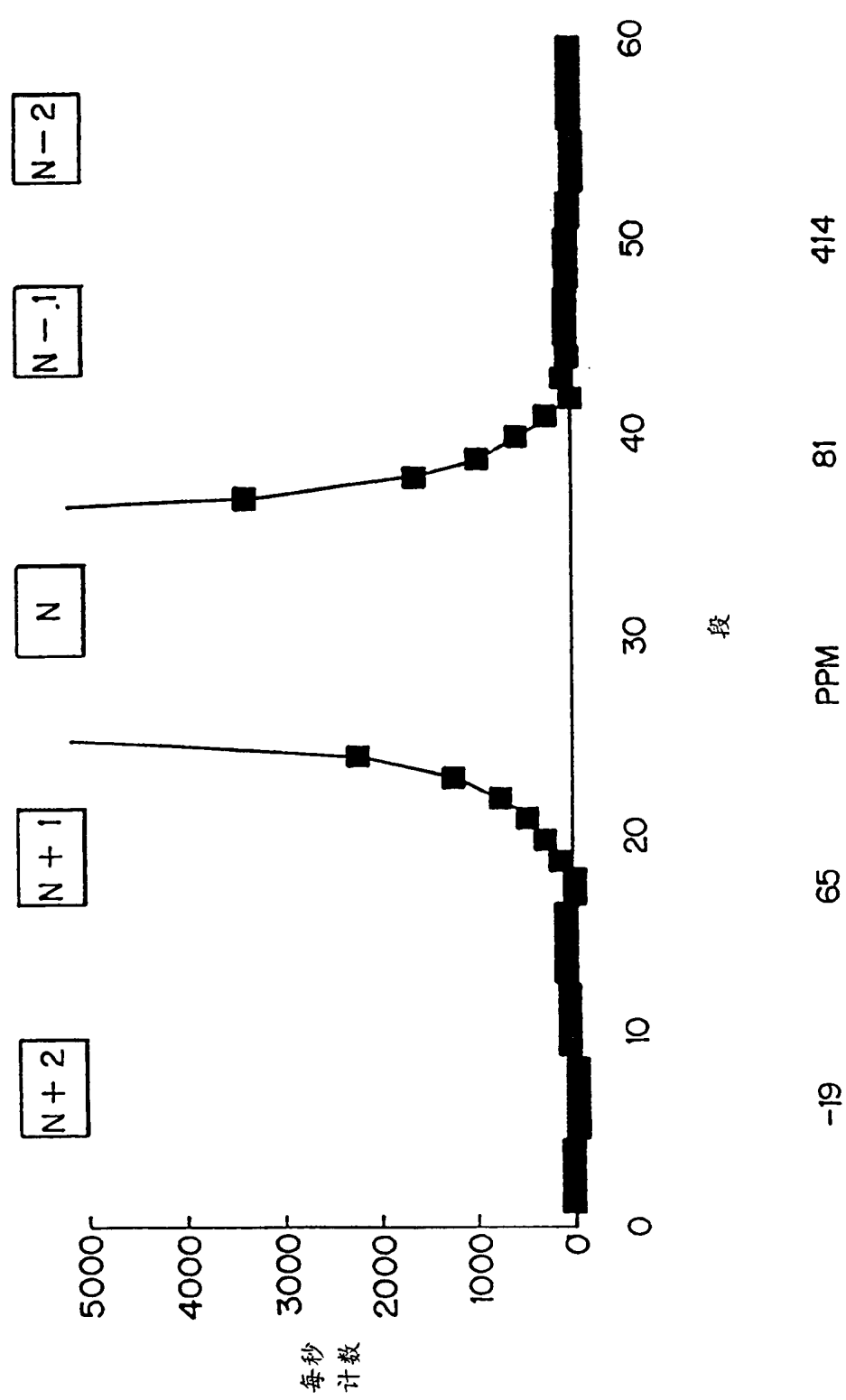


图 4

-19

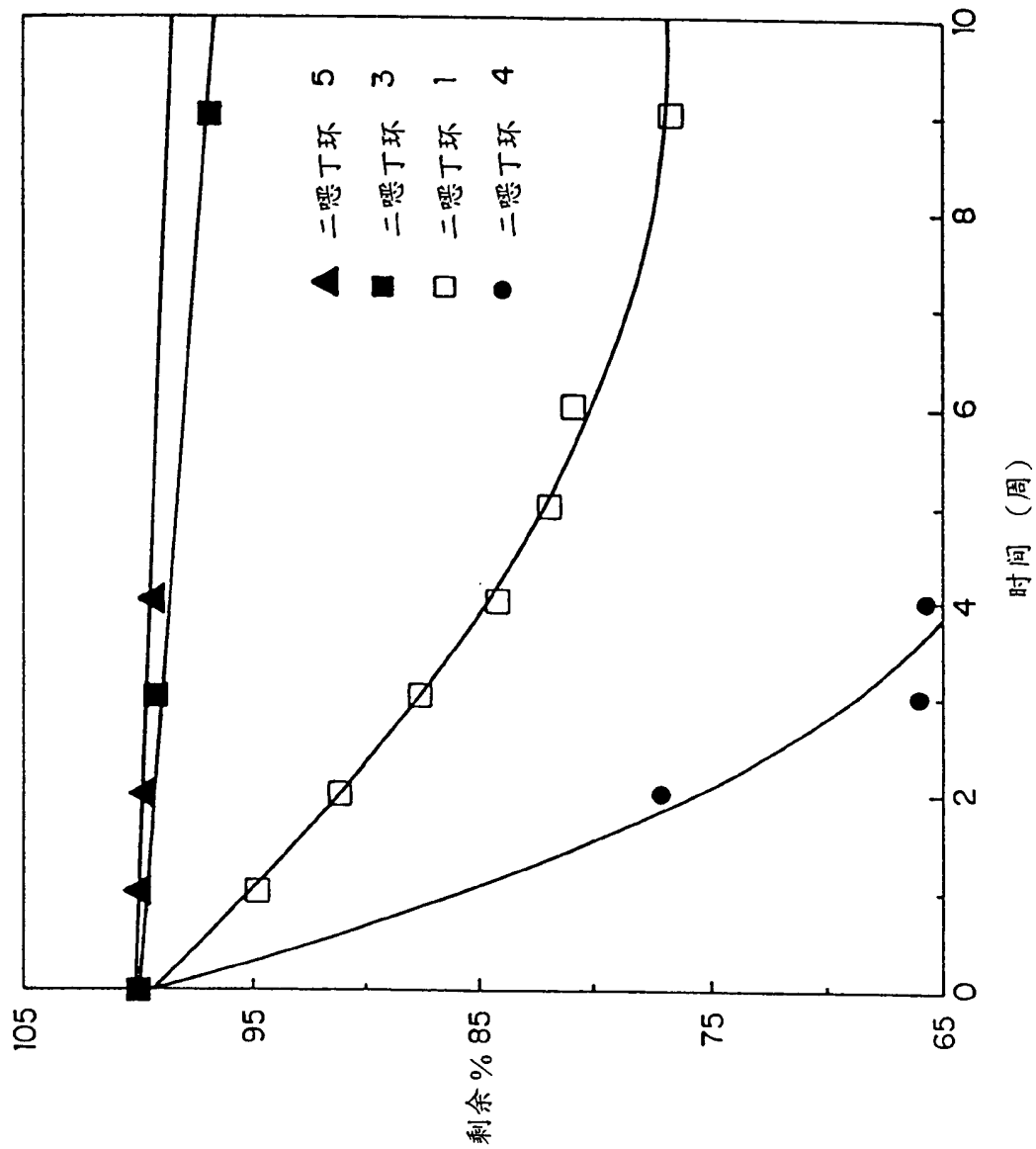


图 5